



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**WANDERSON JUVENCIO KEIJOK**

**OTIMIZAÇÃO E CONTROLE DA SÍNTESE VERDE DE**  
**NANOPARTÍCULAS DE OURO UTILIZANDO O EXTRATO DE *Coffea***  
***arabica***

Vitória, ES

2018

**WANDERSON JUVENCIO KEIJOK**

**OTIMIZAÇÃO E CONTROLE DA SÍNTESE VERDE DE  
NANOPARTÍCULAS DE OURO UTILIZANDO O EXTRATO DE *Coffea  
arabica***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia do Centro de Ciências  
da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Marco Cesar  
Cunegundes Guimarães.

Vitória, ES

2018

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas da Ufes para ser confeccionada pelo autor

---

K27o      Keijok, Wanderson Juvencio, 1991-  
Otimização e controle da síntese verde de nanopartícula de ouro  
utilizando o extrato de Coffea arabica / Wanderson Juvencio  
Keijok. - 2018.  
99 f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Planejamento Fatorial. 3.  
Síntese. 4. Antioxidantes. I. Guimarães, Marco Cesar  
Cunegundes. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro  
de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**WANDERSON JUVEICIO KEIJOK**

**OTIMIZAÇÃO E CONTROLE DA SÍNTESE VERDE DE  
NANOPARTÍCULAS DE OURO UTILIZANDO O EXTRATO DE *Coffea  
arabica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentado em 08 de março de 2018.

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães**  
**Universidade Federal do Espírito Santo - UFES**  
**Orientador**

**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira**  
**Universidade Federal do Espírito Santo - UFES**  
**Membro Interno**

**Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares**  
**Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF**  
**Membro Externo**

A Joaquim Basílio Keijok  
pelo exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus a cada dia mais e mais, pois sempre me levanta depois de cada queda, sempre me faz mais forte depois de cada luta e me refaz a cada amanhecer, renovando minha fé e minha esperança em Seu Amor.

A toda minha família sem a qual nada disso seria possível. Agradeço muito a Deus pela família maravilhosa que tenho. Família de gente muito batalhadora, humilde e acima de tudo feliz.

As pessoas mais guerreiras que conheço nessa vida, ao meu pai (Joaquim Basílio Keijok) e minha mãe (Marilda Juvencio Keijok). Sempre fez de tudo e trabalhou demasiadamente para que eu pudesse estudar e me alimentar. A pessoa por quem eu tenho a maior gratidão desse universo e um amor infinito. Palavras não conseguiriam expressar como sou grato por todo ensinamento. Obrigado família por me ensinar a essência do amor.

Aos meus irmãos Joanilson, Jeanderson e Karol, por estar sempre ao meu lado, por ser minha fonte de incentivo a lutar cada dia sem desanimar, amo muito vocês.

A pessoa que alterou completamente minha vida e tornou meus dias mais felizes. Obrigado Larissa Te Amo.

Ao meu cunhado Raphael e minha sobrinha linda, pela amizade e apoio indispensável para que eu chegasse até aqui. Minha gratidão é infinita.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo ensino e infraestrutura disponibilizados na minha formação.

Ao professor Marco pela orientação. Extremamente competente e atencioso. Por me orientar nesse trabalho, pela paciência e se mostrar tão humano e respeitoso para com o próximo. Fez-me acreditar que não só de vaidade vive a academia. A minha estima por ele caminha em paralelo com a minha consciência de que ele foi um dos grandes responsáveis pelo meu crescimento acadêmico.

Ao meu melhor amigo Jairo P. Oliveira, pelo apoio intelectual e conhecimentos transferidos, sou grato pelos diversos ensinamentos e sua dedicação e paciência. Sou grato a ti por ser o responsável pelo meu crescimento acadêmico.

Ao professor Breno Valentim Nogueira, pelo apoio e incentivo, na minha formação profissional. Eu agradeço por ter feito parte da minha vida, e tenho certeza de que tudo o que aprendi e aprenderei, vou levar por toda a minha vida.

Ao Dr. Adilson R Prado, amigo que participou de boa parte da minha formação.

A todos os colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR, pelo apoio, amizade, preocupações compartilhadas, discussões, contribuições e aniversários comemorados durante todo esse tempo e por proporcionarem um ambiente tão harmonioso para conviver.

A todos os membros do Ministério Jucutuquara, suas orações e apoio foram muito importantes para mim, e nunca vou esquecer tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigado! Com todo o carinho e de coração eu agradeço, e para sempre minha gratidão.

Aos grandes amigos que a Biologia me deu: Josinei, para quem eu sempre ligava para saber onde era a aula. Obrigada meu amigo. Sei que sempre poderei contar com você. Fernando, Cleydianne e João, obrigada pelos bons momentos na faculdade. Foram inúmeros seminários, estágios e provas. Vocês tornaram tudo mais agradável.

À CAPES, CNPq e ao FINEP pelo apoio financeiro ao projeto.

À Banca examinadora pelo aceite ao convite.

## RESUMO

A síntese verde de nanopartículas metálicas vem se tornando incrivelmente popular, principalmente por minimizar problemas de contaminação ambiental e ser capaz de reduzir, estabilizar e potencialmente funcionalizar o nanomaterial. Entretanto, a falta de reprodutibilidade e a escassez de informações sobre os mecanismos de síntese tem inviabilizado sua aplicação. Desta forma, este projeto teve como propósito a investigação dos principais mecanismos que afetam o controle da síntese, utilizando um planejamento fatorial para a preparação de nanopartículas de ouro na presença do extrato de *Coffea arabica* como modelo. Neste caso, o extrato vegetal atuou como agente redutor e estabilizador. As nanopartículas obtidas se apresentaram estáveis (Potencial Zeta, UV-vis e DLS), monodispersas e quase-esféricas (MET), com estrutura cristalina definida (DRX). Além disso, a presença de moléculas aromáticas adsorvidas nas nanopartículas de ouro foi confirmada por FTIR e RAMAN. O planejamento fatorial utilizado para obtenção das nanopartículas de ouro com extrato de *Coffea arabica* possibilitou a síntese controlada e reprodutível, abrindo novas perspectivas para aplicações em diversos campos a serem explorados.

**Palavras-chave:** Síntese verde; Nanotecnologia; Nanopartículas de ouro; Planejamento Fatorial; *Coffea arabica*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Métodos gerais de estabilização coloidal em solução aquosa. (A) Estabilização estérica; (B) estabilização eletrostática; (C,D) estabilização eletrosterica. Adaptado de [32].....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema do mecanismo generalizado de 3 passos para a formação de nanopartículas metálicas. Adaptado de [52].....	23
<b>Figura 3.</b> Esquema mostrando a capacidade de transportar um ou mais agentes na superfície da nanopartícula metálica. Adaptado de [82].....	29
<b>Figura 4.</b> ABTS dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) e suas respectivas temperaturas.....	39
<b>Figura 5.</b> Análise isolada da influência das variáveis no processo de biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando o extrato de <i>Coffea arabica</i> . Gráficos apresentando a influência das variáveis: pH (A,B); Concentração (C,D); Tempo (E,F); Temperatura (G,H); Rotações por minuto (I,J).....	41
<b>Figura 6.</b> Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial completo utilizando extrato de <i>Coffea arabica</i> como agente redutor.....	49
<b>Figura 7.</b> Gráfico de superfície resposta das nanopartículas sintetizadas com <i>Coffea arabica</i> e absorbância (530nm) em função das variáveis (A); Digrama de Pareto indicando as variáveis que foram significativas no processo (B); Influência do pH em relação a variável resposta absorbância máxima (C); Influência da temperatura do extrato em relação a variável resposta absorbância máxima (D) .....	51
<b>Figura 8.</b> Gráfico de contorno demonstrando a condição ótima de síntese, utilizando a reposta do planejamento fatorial completo.....	52
<b>Figura 9.</b> . Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro do ponto médio do planejamento fatorial completo e do ponto ótimo.....	53

<b>Figura 10.</b> Histograma mostrando a distribuição gaussiana de diâmetro (A) e a razão de aspecto (RA) de 1000 partículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (B); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (C).....	55
<b>Figura 11.</b> Difrátograma de raios-X das NP'sAu.....	56
<b>Figura 12.</b> Espectro de infravermelho do extrato de <i>Coffea arabica</i> e do coloide de NP'sAu.....	57
<b>Figura 13.</b> Espalhamento Raman das nanopartículas de ouro e do extrato de café.....	59
<b>Figura 14.</b> Gráfico de DLS das nanopartículas em função da frequência de tamanho (A). Imagens obtidas após a contrastação negativa do material com acetato de uranila, sendo possível observar a presença do extrato no entorno das partículas, confirmando a resposta do DLS (B, C). Potencial zeta da dispersão da condição ótima de síntese (D).....	61
<b>Figura 15.</b> Espectro de absorção mostrando o coloide de NP'sAu com extrato de <i>Coffea arabica</i> na formulação otimizada, em diferentes concentrações de NaCl (A). Gráfico demonstrando o parâmetro de floculação, a partir do aumento da área entre 600 e 800 nm (B).....	62
<b>Figura 16.</b> Espectro de absorção mostrando o coloide de NP'sAu com extrato de <i>Coffea arabica</i> na formulação otimizada, em diferentes faixas de pH (A). Gráfico demonstrando o parâmetro de floculação, a partir do aumento da área entre 600 e 800 nm (B).....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Rendimento em massa dos extratos aquosos.....	38
<b>Tabela 2.</b> Rendimento em massa dos extratos etanólicos.....	38
<b>Tabela 3.</b> Valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.....	43
<b>Tabela 4.</b> Matriz do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de <i>Coffea arabica</i> .....	44
<b>Tabela 5.</b> ANOVA e gráfico de Pareto para síntese de nanopartículas de ouro utilizando planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ . Analisados em relação as respostas de: Largura de banda a meia altura (FWHM) (A, B); Delta lambda ( $\Delta \lambda$ ) (C, D); Área abaixo da curva (E, F); Absorbância máxima (G, H). ....	46
<b>Tabela 6.</b> Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro, com extrato de <i>Coffea arabica</i> .....	48
<b>Tabela 7.</b> Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de café. A variável resposta utilizada foi o Absorbância máxima.....	50
<b>Tabela 8.</b> Combinação de pH e temperatura para obtenção do ponto ótimo teórico.....	54
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre as variáveis respostas do ponto médio e do ponto ótimo teórico.....	54
<b>Tabela. 10</b> Espectros de FTIR das amostras de <i>Coffea arabica</i> .....	57

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância;

ABTS: 2,2-azinobis-3-etil benzotiazolina-6-ácido sulfônico

DLS: Espalhamento Dinâmico da Luz (do inglês DLS- *Dynamic Light Scattering*);

FTIR: Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*);

SERS: Espalhamento Raman amplificada por superfície (do inglês *Surface Enhanced Raman spectroscopy*);

DRX: Difração de raios-X (do inglês *X-Ray Diffraction*);

ICP-MS: Plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas;

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão;

RPSL: Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada;

UV-Vis: Ultravioleta – Visível;

L: Litro;

mg: Miligrama;

mL: Mililitro;

µL: Microlitro;

NP: Nanopartícula;

NP's: Nanopartículas;

NP'sAu: Nanopartículas de ouro;

FWHM: Largura à meia altura, algumas FWHM (do inglês Full width at half maximum);

HAuCl<sub>4</sub>: Ácido tetracloroáurico ;

NaOH: Hidróxido de sódio;

HCl: Ácido clorídrico;

HNO<sub>3</sub>: Ácido nítrico;

pH: Potencial hidrogeniônico;

pKa: Constante de ionização de um ácido;

rpm: Rotações por minuto;

$\theta$ : Teta;

$\lambda$ : Lambda.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	16
2.2. SÍNTESE VERDE.....	19
2.3. EXTRATO DE <i>Coffea arabica</i> .....	24
2.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS....	28
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. EXTRATO VEGETAL.....	32
<b>4.1.1. Preparação do Extrato Vegetal.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2. Extrações aquosas e etanólicas.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.1. Método ABTS .....</b>	<b>33</b>
4.3. BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	34
4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	34
<b>4.4.1. Planejamento Fatorial Fracionado.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.2. Planejamento Fatorial Completo.....</b>	<b>35</b>
4.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	36
<b>4.5.1. Espectroscopia de absorção no UV-vis.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.2. Difração de raios-X.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.3. Espectroscopia no Infravermelho.....</b>	<b>36</b>

<b>4.5.4. Espalhamento Raman .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.5. Potencial Zeta.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.6. Microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.7. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) .....</b>	<b>37</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1. EXTRAÇÃO.....	38
5.2. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS SEPARADAMENTE, PARA CONSTRUÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	40
5.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
<b>5.3.1. Planejamento Fatorial Fracionado.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.2. Planejamento Fatorial Completo.....</b>	<b>47</b>
5.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	54
<b>5.4.1. Microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4.2 Difração de Raios-X (DRX) .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4.3 Espectroscopia no infravermelho.....</b>	<b>56</b>
<b>5.4.4 Espalhamento Raman.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4.5 Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta.....</b>	<b>60</b>
<b>5.4.6 Estudo de estabilidade das nanopartículas.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas metálicas têm sido extensivamente aplicadas em diversas tecnologias, devido principalmente às suas interessantes propriedades ópticas, eletromagnéticas e a alta relação área/volume [1]. No entanto, para a efetiva aplicação desses materiais em dispositivos nanotecnológicos, é crucial o desenvolvimento de sistemas altamente estáveis, que mantenham suas propriedades por longos períodos. As propriedades das NP'sAu são dependentes do tamanho e da forma das partículas e um mesmo material com determinada composição pode apresentar características físicas e químicas diferentes, modificando características como tamanho, auto-organização, estrutura cristalina e forma, ao ponto dos materiais em escala nanométrica exibirem propriedades físicas e químicas distintas dos materiais na escala macroscópica [1-3].

Diferentes processos físicos e químicos são atualmente utilizados para sintetizar nanopartículas metálicas, que permitem obter partículas com as características desejadas [4-6]. No entanto, esses métodos de produção são geralmente caros, intensivos em mão-de-obra e são potencialmente perigosos para o meio ambiente e organismos vivos [5,6]. Assim, existe uma necessidade de um método alternativo, econômico e, ao mesmo tempo, seguro e ambientalmente sadio da produção de nanopartículas metálicas [7,8].

De uma forma geral, existe um interesse generalizado no desenvolvimento de processos não tóxicos, confiáveis, biologicamente compatíveis e favoráveis ao ambiente para sintetizar nanopartículas [9-12]. Durante a última década, demonstrou-se que muitos sistemas biológicos, incluindo plantas e algas [13], bactérias [14], fungos [15] e células humanas [16] podem transformar íons metálicos inorgânicos em nanopartículas metálicas, através das capacidades redutoras das moléculas e substâncias presentes nesses organismos.

A produção de nanopartículas usando plantas exhibe vantagens, como o baixo custo de cultivo, o tempo de produção curto, a segurança e a capacidade de aumentar os volumes de produção, tornando as plantas uma plataforma atraente para a síntese de nanopartículas [10]. Neste tipo de síntese, critérios de seleção



devem ser adotados para escolha da planta, tais como: atividade antioxidante, produção em larga escala, ampla distribuição geográfica e alto potencial para aplicações biomédicas [18]. As plantas produzem biomoléculas funcionais que reduzem ativamente íons metálicos e também estabiliza os nanomateriais formados. No entanto, a aplicação destes sistemas tem sido dificultada pela falta de reprodutibilidade e pela ausência de elucidação dos mecanismos de síntese [17].

Neste trabalho nós estudamos a síntese de nanopartículas de ouro com o extrato de *Coffea arabica* utilizando um planejamento fatorial a fim de verificar as variáveis que interferem no processo e otimizar uma rota de síntese reprodutível de nanopartículas monodispersas. Os nanomateriais foram caracterizados por técnicas de espectroscopia (UV-vis, RAMAN, FTIR), microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e a estabilidade também foi investigada pelo parâmetro de floculação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

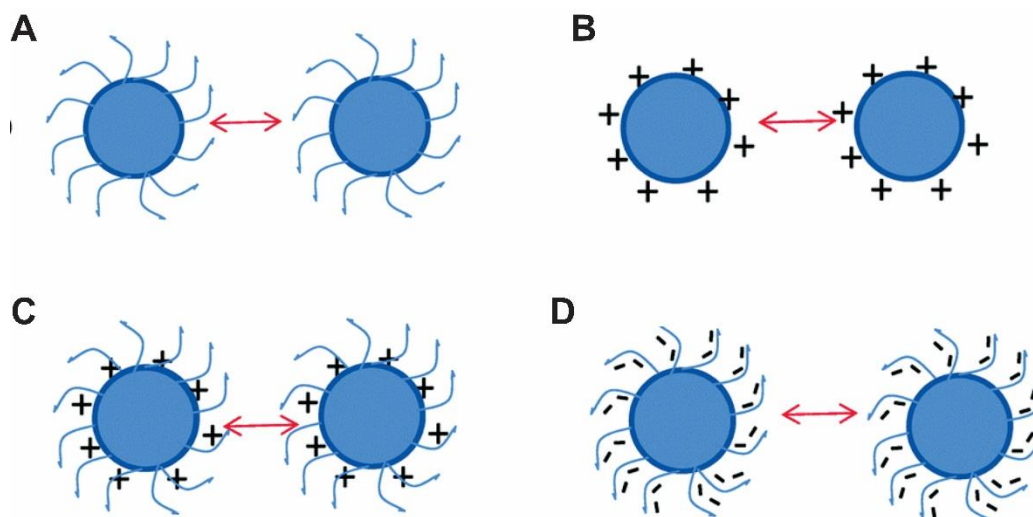
A maioria das fabricações em escala nanométrica prossegue por uma das duas rotas: *Top-down* e *Bottom up*. O "*Top-down*" (de cima para baixo) começa a partir de materiais maiores para miniaturizar os recursos até que as nanoestruturas necessárias sejam alcançadas. Isso pode ser comparado à rocha esculpida, onde um grande bloco é gradualmente espremido até que a forma e os detalhes necessários sejam alcançados. O outro processo é o *Bottom-up* (de baixo para cima) que começa com blocos de construção básicos, como pequenas moléculas ou mesmo átomos e os monta na estrutura requerida [19].

A síntese de nanopartículas em fase líquida é mostrada na literatura por meio de diversos métodos. Sabendo que cada metodologia possui propriedades específicas, o coloide formado durante a síntese se resume em quatro componentes: Agente redutor, precursor, estabilizante e meio reacional.

A formação das nanopartículas ocorre através de dois passos, cujo primeiro é a redução do íon metálico proveniente de um sal do metal que será o precursor das nanopartículas. Para ocorrer a redução do cátion de ouro pode ser utilizado diversos tipos de agentes redutores, como o citrato de sódio [20], borohidreto de sódio [21], ácido ascórbico [22], entre outros.

Existem diferentes precursores metálicos destinados à formação de nanopartículas, dentre esses podemos destacar o ouro [23, 24], a prata [25, 26], o ferro [27] e o cobre [28]. Entre os metais utilizados para síntese de nanopartículas, o ouro exibe propriedades físico-químicas que tem atraído atenção dos pesquisadores. O ouro é um material inerte e resistente à oxidação, o que permite trabalhar com esse material em processos e dispositivos em nanoescala [29].

O ouro possui vantagens na sua utilização durante a síntese, mas a escolha do agente redutor durante o processo de síntese necessita de um controle rigoroso das variáveis, como pH, temperatura, concentração, tempo de síntese, entre outras variáveis. O processo de síntese de nanomateriais é multifatorial e as alterações nesses parâmetros, podem causar modificações durante a geração, formando estruturas diversificadas em tamanho, forma e funcionalização, os quais interferem diretamente na sua estabilidade. Essa instabilidade ocorre após as reduções dos íons de ouro, formando os átomos que naturalmente tendem a unir-se formando nanopartículas e essas por sua vez tendem também a se aglomerar no processo conhecido como digestão, onde há o crescimento das NP's. Esse processo ocorre devido à alta instabilidade das NP's geradas após a redução do íon. Para estabilizar as NP's, temos que recorrer a alterações que as impeçam de se aproximar umas das outras o suficiente para unirem-se [30,31]. Na Figura 2 é ilustrado três técnicas de estabilização: estabilização estérica, estabilização eletrostática e estabilização eletrosterica [32].



**Figura 1.** Métodos gerais de estabilização coloidal em solução aquosa. (A) Estabilização estérica; (B) estabilização eletrostática; (C,D) estabilização eletrosterica. Adaptado de [32].

A instabilidade das nanopartículas de ouro pode também ser identificada pela alteração da coloração do coloide, que se modifica de acordo com o estado de agregação dos átomos após a nucleação das nanopartículas.

Quando submetidos à radiação eletromagnética, as nanopartículas são polarizadas devido a um campo elétrico. Este campo elétrico interage com elétrons livres na superfície da nanopartícula (plasmon de superfície) fazendo com que eles oscilem em determinadas frequências. Quando a frequência de luz é igual à frequência da nuvem de elétrons que circunda a nanopartícula, eles entram em ressonância. Essas oscilações ressonantes são conhecidas como ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR – *Localized Surface Plasmons Resonance*). A LSPR pode combinar com as frequências de cores no espectro de luz visível e absorver essa cor. Em tamanhos pequenos, como 30nm, as nanopartículas de ouro refletem luz vermelha, dando-lhes uma cor vermelha. Em tamanhos maiores, como 80nm, as nanopartículas de ouro absorvem luz vermelha e refletem luz azul, fazendo com que o coloide seja azul. Uma vez que o formato é grande o suficiente ( $> \sim 100\text{nm}$ ), a nuvem de elétrons irá cercar uniformemente todo o nanomaterial, e os fótons de luz não poderão penetrar na nuvem de elétrons.

À medida que o tamanho da partícula continua a aumentar em direção ao limite de massa, os comprimentos de onda de LSPR se movem para a parte infravermelho do espectro e os comprimentos de onda mais visíveis são refletidos, dando às nanopartículas uma cor transparente ou translúcida. A LSPR pode ser ajustada variando o tamanho ou a forma das nanopartículas, levando a partículas com propriedades ópticas personalizadas para diferentes aplicações [33].

## 2.2. SÍNTESE VERDE

Síntese verde, síntese biológica e síntese biogênica são termos comumente usados para a síntese ecologicamente correta de nanopartículas. Normalmente, as nanopartículas são sintetizadas através de métodos químicos, físicos e biológicos. As sínteses físicas e químicas possuem consumo intensivo de energia e às vezes podem envolver substâncias químicas tóxicas, enquanto as técnicas biológicas são rentáveis, limpas, atóxicas e ecologicamente corretas. A via de síntese biológica tem sido efetuada, sobretudo, através do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias e actinomicetos [34].

A nanobiotecnologia verde é enriquecida na medida em que utiliza princípios da química verde que gera uma nova e interessante exploração de metodologias e técnicas químicas que reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes de produtos tóxicos, que são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente [35].

Extratos provenientes de organismos biológicos podem atuar como agentes redutores e estabilizantes na síntese de nanopartículas de ouro. A redução dos íons  $Au^{+3}$  por conjuntos de moléculas encontradas nos extratos de plantas, tem gerado um enorme volume de pesquisas bem-sucedidas utilizando estes compostos [36-38].

A produção de nanopartículas usando plantas ganha atenção devido algumas vantagens, como o baixo custo de cultivo, o tempo de produção curto, a segurança e a capacidade de aumentar os volumes de produção tornando as plantas uma plataforma atraente para a síntese de nanopartículas [35].

As plantas que possuem uma grande capacidade de acumulação e redução de íons metálicos, são capazes de acumular 100 vezes mais metais em comparação com as plantas não acumuladoras, que crescem no mesmo substratos, uma abordagem conhecida como *phytomining*. Os metais acumulados pelas plantas podem ser recuperados após a colheita. Curiosamente, o estudo do processo de bioacumulação de metais nas plantas revelou que os metais são geralmente depositados na forma de nanopartículas. Por exemplo, *Brassica juncea* (mostarda) e *Medicago sativa* (alfafa) acumulam nanopartículas de prata de 50 nm (13,6% do seu próprio peso) quando cultivadas em nitrato de prata como substrato [36]. Além disso, foram detectados icosaedros de ouro de 4 nm de tamanho em *M. sativa* [37], e partículas de cobre semi-esféricas com um tamanho de 2 nm foram observadas em *Iris pseudacorus* (íris amarela) [38] cultivados em substratos contendo sais dos respectivos metais.

Plantas inteiras podem, obviamente, ser usadas para produzir nanopartículas metálicas. No entanto, existem certas limitações que devem ser levadas em consideração na aplicação industrial desta tecnologia. Em primeiro lugar, o tamanho e a forma das nanopartículas variam dependendo da sua localização na planta, o que pode depender de diferenças no conteúdo de íons metálicos em vários tecidos e a subsequente possibilidade de movimentação e penetração das nanopartículas. Esses fatores podem influenciar o nível de deposição do metal em torno das nanopartículas e também na perspectiva de novos eventos de nucleação (iniciação da formação de nanopartículas) [37]. A heterogeneidade do tamanho e da morfologia das nanopartículas produzidas com plantas inteiras pode dificultar a sua utilização em aplicações em que são necessários tamanhos e formas específicas finamente ajustadas. Assim, existe uma incapacidade de adaptar as nanopartículas sintetizadas com planta inteira aos requisitos do mercado. Além disso, a extração eficiente, isolamento e purificação de nanopartículas a partir de material vegetal é um procedimento difícil e problemático, com baixa recuperação.

Nesse sentido, as abordagens *in vitro* foram ativamente desenvolvidas nos últimos anos, nas quais os extratos de plantas são utilizados para a formação de nanopartículas. Essas abordagens fornecem um controle mais flexível sobre o

tamanho e a forma das nanopartículas (por exemplo, alterando o pH médio e a temperatura de reação), além de facilitar a purificação. Significativamente, esse processo ocorre muito mais rápido do que a síntese de nanopartículas em plantas inteiras, porque a reação prossegue quase que instantaneamente, sem o atraso necessário para a absorção e difusão de íons metálicos. As abordagens *in vitro* foi demonstrada utilizando os extratos a partir de uma variedade de diferentes espécies de plantas, em combinação com uma variedade de ácidos e sais de metais, tais como cobre, ouro, prata, platina, ferro e muitos outros [38, 39].

Por exemplo, os extratos de *Pelargonium graveolens* (rose geranium) foram usados para reduzir os íons de ouro em nanopartículas de forma icosaédrica e decaédrica de 20 a 40 nm e estabilizadas [40]. O extrato de *Azadirachta* foi utilizado para reduzir o ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) em triângulos de ouro e hexágonos planos com um tamanho de 50-100 nm [41]. O extrato de folha de *Aloe barbadensis* (aloe vera) foi utilizado para produzir partículas  $\text{In}_2\text{O}_3$  cúbicas de 5 a 50 nm de tamanho [42]. Foi demonstrado usando espectroscopia FTIR que os metabolitos da planta, como açúcares, terpenóides, polifenóis, alcaloides, ácidos fenólicos e proteínas desempenham um papel importante na redução de íons metálicos em nanopartículas e no suporte à estabilidade subsequente [40,42,43]. Sugeriu-se que o controle sobre o tamanho e a morfologia das nanoestruturas podem ser conectados à interação dessas biomoléculas com íons metálicos [40]. Várias plantas diferem na concentração e composição destes componentes biologicamente ativos. Isso pode explicar em parte a diversidade morfológica das nanopartículas descritas: triângulos, hexágonos, pentágonos, cubos, esferas, elipsoides, nanofios e nanorods. A diversidade na morfologia e tamanho das nanopartículas sintetizadas, a partir de uma variedade de íons metálicos utilizando extratos de várias plantas, tem sido descrita em detalhes nas revisões [7,44,45].

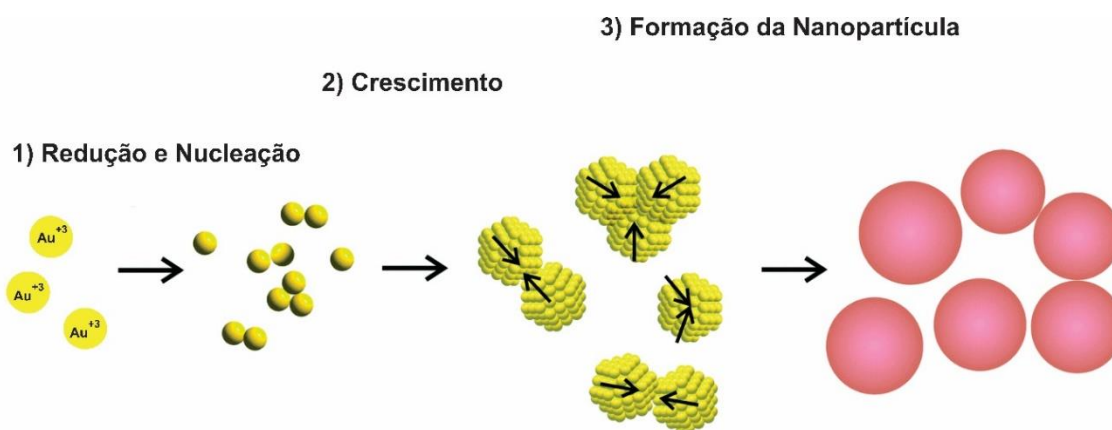
Usando a espectroscopia FTIR de nanopartículas sintetizadas com plantas ou extratos de plantas, demonstrou-se que os terpenoides são frequentemente associados às nanopartículas. Os terpenoides desempenham um papel fundamental na transformação de íons de prata em nanopartículas em reações usando extratos de folhas [46]. Com base nos dados de espectroscopia FTIR,

foi sugerido [47] que a dissociação de um próton do grupo eugenol OH resulta na formação de estruturas de ressonância capazes de uma oxidação adicional. Este processo é acompanhado pela redução ativa de íons metálicos, seguida da formação de nanopartículas.

Os flavonoides são um grande grupo de compostos polifenólicos que compreendem várias classes: antocianinas, isoflavonoides, flavonóis, chalconas, flavonas e flavanonas, que podem quelar e reduzir ativamente os íons metálicos em nanopartículas. Os flavonoides contêm vários grupos funcionais capazes de formar nanopartículas [48].

Existem dados segundo os quais os açúcares presentes em extratos vegetais também podem induzir a formação de nanopartículas metálicas. Sabe-se que os monossacarídeos, como a glicose, podem atuar como agentes redutores. Os monossacarídeos que contêm um grupo cetona, por exemplo, frutose, podem atuar como antioxidantes somente quando passados por uma série de transformações tautoméricas de uma cetona a um aldeído [49].

Em geral, o mecanismo de síntese de nanopartículas metálicas em plantas e extratos vegetais inclui três fases principais: 1) a fase de ativação durante a qual ocorre a redução dos íons metálicos e a nucleação dos átomos do metal reduzidos; 2) a fase de crescimento durante a qual as pequenas nanopartículas adjacentes se fundem espontaneamente em partículas de tamanho maior, que é acompanhado por um aumento na estabilidade termodinâmica das nanopartículas; 3) a fase de terminação do processo determina a forma final das nanopartículas [50-52]. O processo de formação das nanopartículas é mostrado esquematicamente na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema do mecanismo generalizado de 3 passos para a formação de nanopartículas metálicas. Adaptado de [52]

À medida que a duração da fase de crescimento aumenta, as nanopartículas se agregam para formar nanoesferas, nanotubos, nanoprismas, nanohexaedros e uma variedade de outras nanopartículas de forma irregular [50,53]. Na fase de formação da nanopartícula, as nanopartículas adquirem a conformação mais energeticamente favorável, sendo este processo fortemente influenciado pela capacidade estabilizadora do extrato da planta. Portanto, o processo de redução dos íons metálicos para a formação de nanopartículas, é afetado por uma grande quantidade de fatores; além da natureza do extrato contendo biomoléculas ativas em diferentes combinações e concentrações, incluem outras variáveis como o pH da mistura de reação, temperatura, tempo de reação, concentração e potencial eletroquímico de um íon metálico [7, 54, 55].

O valor de pH de um extrato vegetal, exerce uma grande influência na formação das nanopartículas [56]. Uma mudança no pH resulta em uma mudança de carga nas moléculas naturais contidas no extrato, o que afeta sua capacidade de unir e reduzir cátions e ânions metálicos e no processo da síntese de nanopartículas e isso, por sua vez, pode afetar a forma, o tamanho e o rendimento durante a síntese. No pH 2.0, os íons metálicos mais acessíveis aparentemente estão envolvidos em um menor número de eventos de nucleação, o que leva à aglomeração do metal [57]. Em contraste, demonstrou-se que utilizando extratos de peras as nanopartículas de ouro apresentariam formas hexagonais e triangulares em pH alcalino, enquanto as nanopartículas não se formam a pH



ácidos [56]. No caso de íons de  $\text{Ag}^{1+}$  e o pó de tubérculo de *Curcuma longa* (açafrão), um número substancialmente maior de nanopartículas de prata é sintetizado a pHs alcalinos, nos quais os extratos podem conter grupos funcionais de carga negativa capazes de fazer ligações e reduções eficientes dos íons de prata [57].

A temperatura é outro fator importante que afeta a formação das nanopartículas em extratos de plantas [58, 59]. Em geral, a elevação da temperatura aumenta a taxa de reação e a eficiência da síntese. Verificou-se que as nanopartículas de prata com forma triangular produzidas com a planta *Medicago sativa*, são formadas somente a temperaturas acima de 30 ° C [60]. Além disso, experiências sobre a síntese de nanopartículas de prata com extratos de *Aloysia citrodora* demonstraram que o aumento da temperatura de reação é acompanhado por um aumento na eficiência da redução de íons de prata [61]. Em experimentos com extratos de *Cassia fistula*, verificou-se que a temperatura também pode afetar a forma estrutural das nanopartículas sintetizadas, onde os nanorods de prata são formados principalmente à temperatura ambiente, enquanto que as nanopartículas esféricas predominam a temperaturas acima de 60 ° C [62]. Neste caso, acredita-se que temperaturas mais elevadas alteram a interação fitoquímica com a superfície das nanopartículas, inibindo a incorporação de nanopartículas adjacentes na estrutura dos nanomateriais.

Este método sintético com extrato de planta ou biomassa exemplifica a aplicação promissora dos recursos biológicos vegetais para síntese de nanopartículas metálicas.

### 2.3 EXTRATO DE *Coffea arabica*

Neste trabalho utilizamos o extrato de *Coffea arabica* como agente redutor, devido a sua composição química e por ser uma bebida que faz parte da cultura brasileira e exerce um importante papel na economia do estado do Espírito Santo.

O *Coffea arabica* pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea* e a espécie *arabica*, oriunda de regiões montanhosas, é uma árvore delicada e tem um porte de 5 a 6 metros de altura e requer clima temperado. A árvore da espécie Robusta (*Coffea canephora*) por sua vez é caracterizada por ser muito produtiva e resistente a doenças [63].

A espécie *arabica* é considerada economicamente mais importante do que a espécie *canephora*. A produção mundial da espécie *Coffea arabica* e *Coffea canephora* corresponde a 70 e 30% respectivamente [63]. O Brasil é considerado um importante exportador de café, sendo um dos maiores representantes do comércio mundial de café e também um grande consumidor do produto [64]. O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e representa um importante item no comércio internacional [65,66]. A produção e o processamento do café causam um considerável impacto sócioeconômico em função dos mais de 25 milhões de empregos gerados em todo o mundo [63].

Além das pesquisas sobre o consumo e a importância econômica, outras têm sido feitas para determinar os componentes do café e suas respectivas funções na fisiologia vegetal dos grãos, na determinação das características sensoriais e dos efeitos associados à saúde humana, bem como o desenvolvimento de produtos a partir destas substâncias [64,67].

O grão verde de *Coffea arabica*, dependendo da variedade considerada, apresentam teores de 8,6 a 12,6% de proteínas, 12,3 a 14,0% de lipídios e 3,5 a 4,5% de minerais. Como parte da composição mineral do *Coffea arabica* destacam-se Ca, K, Mg, Na, P, Co, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn [64]. Além destes nutrientes, o *Coffea arabica* também contém fitoquímicos como ácidos fenólicos, cafeína e melanoidinas. A composição dos grãos verdes de *Coffea arabica* em porcentagem de base seca para as variedades Arabica e Robusta corresponde, respectivamente, a 12 - 18% e 9 - 13% de lipídios, 3,0 - 4,2 % e 4,0 - 4,5 % de minerais, 5,5 - 8,0 % e 7 - 10 % de ácidos clorogênicos, 6 - 8 % e 5 - 7 % de oligossacarídeos, 50 - 55 % e 37 - 47 % de polissacarídeos, 0,9 - 1,2 % e 1,6 - 2,4 % de cafeína. A composição de alguns compostos não difere entre as variedades consideradas e correspondem a 2 % de aminoácidos, 11 - 13 % de proteína e 1,5 - 2,0 % de ácidos alifáticos [68].

O processamento dos alimentos induz uma série de transformações bioquímicas entre elas a reação de Maillard [69]. Entre os produtos dessa reação estão as melanoidinas, polímeros hidrossolúveis de coloração parda que representam uns dos principais componentes da bebida à base de café. Representam 25% da matéria seca do café, exercem um importante papel no desenvolvimento do aroma e sabor de alimentos e bebidas e estão amplamente distribuídas em pães, carnes, malte, mel, chocolate e café.

Durante a reação de Maillard um carboidrato com extremidade redutora condensa-se com um composto que tenha um grupo amino livre. Durante a torrefação do café, parte dos seus compostos fenólicos são incorporados às melanoidinas [70]. Os ácidos clorogênicos doam um grupo carbonil para as melanoidinas no primeiro estágio da reação de Maillard. O interesse sobre esses compostos tem aumentado devido ao seu efeito antioxidante cujos mecanismos de ação são quelar metais para formar complexos inativos, interromper a reação em cadeia doando um átomo de hidrogênio, reduzindo hidroperóxidos a produtos não radiculares e capturando radical hidroxil [65,66,70].

Experimentos da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de grãos de café, foram executados a diferentes graus de torrefação, onde foram obtidas as torras clara, média e escura. Em relação às torras clara e média, apesar da diminuição do conteúdo de ácidos clorogênicos, a atividade antioxidante foi maior na torra média (45,2%) do que na torra clara (18,9%) em comparação ao *Coffea arabica in natura*. Entretanto, não aumentou a atividade antioxidante da torra escura em relação a torra média. Os autores sugerem que a formação de melanoidinas com capacidade antioxidante ocorre somente em uma fase da torrefação do café. As condições aplicadas na torra escura causam degradação parcial de ácidos clorogênicos, o que leva à redução da atividade antioxidante do grau de torrefação escura em relação à torrefação média [71].

A cafeína é um composto químico classificado como alcaloide do grupo das xantinas, é uma metilxantina contida nos grãos de café. O conteúdo de cafeína nas sementes da espécie robusta é maior do que nas sementes arábica. O café da variedade robusta é geralmente usado na fabricação de café instantâneo, enquanto que o *Coffea arabica*, é usado na obtenção de café em pó torrado [72].

Os compostos heterocíclicos presentes no *Coffea arabica* é outro grupo de moléculas com atividade antioxidante importante. Já foram identificados e quantificados mais de 300 compostos incluindo pirróis, furanos, tiazóis, tiofenos imidazólicos e pirazinas. Esses compostos são formados durante a reação de *Maillard*, têm baixo peso molecular, conferem odor e sabor a alimentos torrados e apresentam atividade antioxidante [74].

Os benefícios do consumo de café foram avaliados através da identificação de compostos antioxidantes em frações obtidas a partir da bebida de café comercial. A análise das frações por cromatografia gasosa com espectrometria de massa identificou a presença de compostos heterocíclicos com capacidade antioxidante incluindo furanos, pirróis e maltol. A inibição da lipoperoxidação pelas sete frações obtidas a partir da solução aquosa foi avaliada pelo método de TBARS na concentração de 300 µg/mL e apresentaram porcentagens de inibição entre 10 e 90% [74].

As plantas vasculares sintetizam uma grande variedade de moléculas orgânicas denominadas como metabólitos secundários [75]. Compostos fenólicos estão distribuídos em praticamente todo o reino vegetal, podendo ser encontrados em diversas partes das plantas em quantidades significativas.

Os ácidos fenólicos correspondem a um terço da ingestão diária de polifenóis cujas principais fontes alimentares são as bebidas como vinho, chás, sucos de frutas (exceto suco de laranja) e café [76-78]. Entre os compostos fenólicos contidos nas sementes de *Coffea arabica* estão o ácido caféico, o ácido clorogênico e outros derivados do ácido cafeoilquínico [65]. Estes compostos também estão presentes na maçã, pêra, alcachofra, berinjela e suco de frutas cítricas.

Os ácidos fenólicos são classificados em cinco grandes grupos, sendo que quatro destes são flavonóides e o quinto representa os ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos clorogênicos são os derivados hidroxicinâmicos mais abundantes e de maior distribuição nos alimentos [77,78].

O grupo dos ácidos clorogênicos representa um conjunto de compostos fenólicos de ocorrência natural nos alimentos, formado principalmente pela esterificação

do ácido quínico com os ácidos cinâmico, caféico, ferúlico ou pelo ácido p-cumárico. O ácido caféico é o representante fenólico mais frequentemente encontrado nos alimentos, tanto na forma livre, quanto esterificado com o ácido clorogênico (ácido 5-o-cafeoilquínico); sua forma mais abundante na natureza [80].

Entre os ácidos clorogênicos contidos no café, o 5-o-cafeoilquínico é o mais abundante. O café apresenta em sua composição 4,3 - 7,2% de ácidos cafeoilquínico, 0,3 - 1,2% de feruloilquínico, 0,8 - 2,5% de ácidos dicafeoilquínico [78].

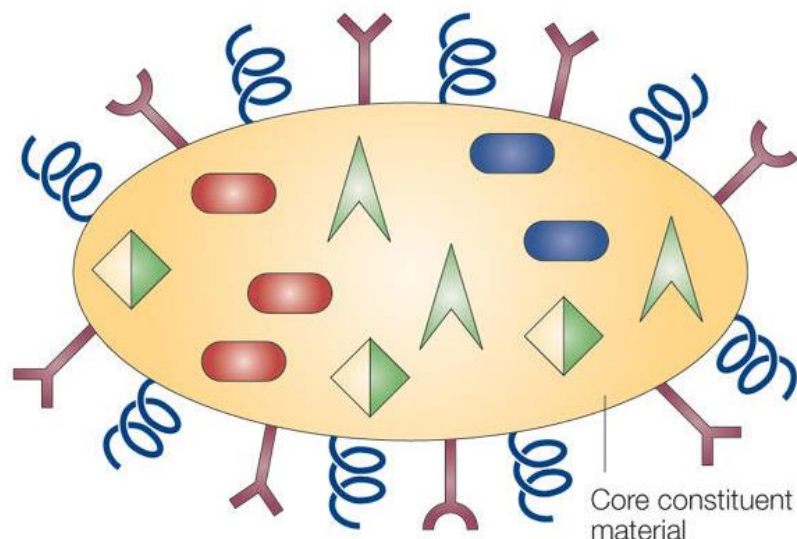
Diversos estudos foram feitos para a determinação dos teores de ácidos clorogênicos no café. O conteúdo total de ácido clorogênico na variedade arabica é de 5,5 - 8,0% e 7,0 - 10,0% na variedade robusta. Segundo Iwai *et al.* [81], o *Coffea arabica* contém considerável quantidade de ácidos hidroxicinâmicos.

Considerando o grande consumo diário de café por uma significativa parcela da população, este alimento pode ser considerado um dos principais fornecedores de compostos fenólicos para o organismo.

## 2.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS

A aplicação biomédica das nanopartículas metálicas é provavelmente dependente de algumas características como tamanho, forma e composição da superfície. A análise estrutural da superfície do nanomaterial é fundamental, para o sucesso na eventual aplicação.

As nanopartículas metálicas consistem em centenas de milhares de átomos. Tais partículas são tipicamente sintetizadas em uma solução contendo moléculas que podem se ligar a superfície da NP (Figura 3), com um grupo de cabeça de ancoragem que atado à superfície do nanomaterial e uma cauda dirigida para longe dela. A condição de equilíbrio do núcleo inorgânico minimiza a energia da área superficial exposta e a energia específica das faces. Um núcleo poliédrico, que exhibe apenas átomos de superfície de alta coordenação e área ligeiramente mais exposta do que uma esfera, é típico.



**Figura 3.** Esquema mostrando a capacidade de transportar um ou mais agentes na superfície da nanopartícula metálica. Adaptado de [82].

Se os ligantes de superfície se ligam seletivamente a certas facetas de uma NP crescente, eles reduzem a energia superficial dessas facetas em relação às outras, gerando uma estabilização ao nanomaterial. A camada de ligantes também pode bloquear a entrega de novos reagentes para a superfície da NP. Estes fatores termodinâmicos e cinéticos são amplamente utilizados para a síntese de NP's com formas anisotrópicas [83,84].

A camada superficial que recobre cada faceta da NP pode ser vista como uma monocamada. Primeiramente preparados e caracterizados na década de 1980, as camadas que reveste as nanopartículas serviram de base para a compreensão da interface orgânica ou inorgânica e fornecem um ponto de partida conveniente para descrever os ligantes na superfície do nanomaterial [85]. A forte interação entre os átomos de ouro e de enxofre ( $\sim 2$  eV) permite que os surfactantes livres se liguem firmemente à superfície do metal [86]. Uma interação mais fraca de *van der Waals* entre as caudas de hidrocarbonetos ( $\sim 0,07$  eV por grupo  $\text{CH}_2$ ) estimula a densidade do recobrimento orgânico [86]. Além deste "modelo padrão", os motivos das ligações alternativas, incluindo a estrutura de "grampo"  $\text{RS-Au-SR}$ , podem ser importantes na baixa cobertura superficial [87].

As dimensões nanométricas e a heterogeneidade intrínseca de cada NP tipicamente expõem várias facetas com diferentes padrões de átomos de superfície, tornam o estudo experimental das superfícies das NP's desafiador. Atualmente não há nenhuma técnica que forneça reconstrução no nível atômico da camada de cobertura NP. Em vez disso, um conjunto de métodos deve ser aplicado para obter informação complementares sobre a ligação do ligante a NP, e a estrutura da camada de cobertura e as interações entre os ligantes na superfície e no ambiente circundante [88,89].

Um conjunto de espectroscopias, espalhamento, imagens e técnicas computacionais têm sido usados para caracterizar as superfícies de NP's. Esses métodos fornecem informações complementares sobre a interface que pode ser dividida nos seguintes componentes: (i) ligações químicas entre o núcleo do nanomaterial e os ligantes de superfície, (ii) a composição e estrutura das moléculas do ligante e (iii) as propriedades efetivas de toda a camada de cobertura, como espessura efetiva, densidade e constante dielétrica.

A espectroscopia na região infravermelha é uma maneira simples e confiável de sondar a superfície do nanomaterial, fornecendo informações sobre a estrutura das moléculas do ligante. A largura e a posição das ressonâncias no infravermelho, podem ser utilizadas para a investigação das conformações da cadeia e a ordem molecular da camada de cobertura [90]. O Espalhamento Raman é particularmente útil para caracterizar os ligantes inorgânicos com átomos pesados, vibrando em baixas frequências [89,91].

A dispersão de raios-X de pequeno ângulo (SAXS) e a dispersão de luz dinâmica (DLS) foram usadas para estudar a espessura efetiva da camada de cobertura nanomaterial e sua contribuição para o raio hidrodinâmico global da partícula [92-94].

Outra ferramenta para a investigação da superfície do nanomaterial é a microscopia eletrônica de transmissão (MET), ela permite obter imagens dos nanomateriais sintetizados, e, em alguns casos, de seus ligantes de superfície, através da contrastação negativa. Uma das principais vantagens das técnicas de

microscopia é a capacidade de examinar NP's no nível de uma única partícula, revelando aspectos desses materiais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Otimizar a síntese de NP'sAu com extrato de semente verdes de *Coffea arabica* utilizando planejamento fatorial.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar as condições ótimas de extração (solvente e temperatura) de acordo atividade antioxidante;

Identificar as variáveis que afetam o processo de síntese das NP'sAu com extrato de sementes verdes de *Coffea arabica* utilizando planejamento fatorial fracionado;

Determinar uma rota de síntese otimizada de NP'sAu através do planejamento fatorial completo;

Caracterizar as NP'sAu em relação ao tamanho, forma e dispersão, bem como quanto aos componentes orgânicos envolvidos na sua estabilização;

Analisar a estabilidade das NP'sAu em diferentes condições (pH e concentração de sais) visando aplicações biológicas.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica. Todas as vidrarias e materiais utilizados foram previamente lavados 3 vezes com solução de água régia (1HNO<sub>3</sub>:3HCl) e em seguida lavadas 10 vezes com água



destilada e secos em temperatura ambiente. A água ultrapura foi utilizada para todos os ensaios e preparos de soluções, obtidas pelo sistema Milli-Q da Millipore 18Ω.

#### 4.1 EXTRATO VEGETAL

A fim de determinar o melhor extrato para ser utilizado no projeto avaliamos a atividade antioxidante dos extratos etanólicos e aquosos de *Coffea arabica* através dos ensaios de atividade antioxidante ABTS.

##### 4.1.1 Preparação do Extrato Vegetal

As sementes de *Coffea arabica* foram coletadas no estado do Espírito Santo, município de Domingos Martins, em uma propriedade particular (Fazenda de Pedra Azul), no período de verão, abril de 2016

As sementes verdes de Café arábica foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura para remoção de impurezas e depois secas em temperatura ambiente 25 ° C por 16 horas. As sementes secas foram trituradas em um pequeno moinho elétrico (Di Grano Cadence, MDR302), as sementes em pó foram transferidas para uma garrafa de vidro âmbar e colocadas na geladeira antes do processo de extração.

##### 4.1.2 Extrações aquosas e etanólicas

O extrato aquoso das sementes secas foi feito com água ultrapura. Cerca de 10 gramas de semente triturada foi misturada em 100 mL de água ultrapura. O extrato aquoso foi aquecido a 25° C, 45°C, 65° C e 85° C, sendo preparado quatro extratos com as respectivas temperaturas. Cada mistura foi aquecida por 1 hora e mantido sobre agitação orbital (400 rpm), no balão de fundo redondo acoplado com condensador de *Graham*. Após o término do processo, a solução foi filtrada com papel qualitativo 3µm e com fibra de celulose 0,22 µm. O filtro

com material retido foi colocado na estufa para secagem, após a secagem do material foi pesado novamente o papel filtro, e o filtrado foi levado para o freezer -80 e após 24 horas levado para ser liofilizado (Liofilizador L101 da Liotop®).

Os extratos etanólicos também foi preparado com as sementes trituradas com aquecimento à 25° C, 45°C, 65° C e 85° C, sendo preparado quatro extratos com as respectivas temperaturas. Os extratos etanólicos foram preparados através do mesmo protocolo seguido para a extração aquosa, exceto a secagem, feita com utilização da estufa.

## 4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Devido à complexidade da composição desse extrato, a separação e o estudo individual de cada substância antioxidante são praticamente inviáveis além de custosos. Por isso, espera-se dos pesquisadores que venham a ter métodos rápidos para a determinação da atividade antioxidante. Um teste de atividade antioxidante com base em reações químicas parece não ser condizente com situações reais, ainda que existem muitas publicações com medida de atividade antioxidante *in vitro* [95].

Descrever a técnica o processo

Dentre os métodos utilizados o método ABTS é o principal método na avaliação do potencial antioxidante e redutor de extratos vegetais.

### 4.2.1 Método ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2- azino – bis – 3- etil – benztiazolina – 6- ácido sulfônico) é bastante utilizado e apresenta boa estabilidade em certas condições de análise. O radical ABTS deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas, e pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada. [97].

### 4.3 BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de oxirredução utilizando solução de  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (concentração estabelecida a partir de estudos prévios do grupo) (Sigma-Aldrich). As demais condições experimentais foram determinadas pelo planejamento experimental abaixo. Após cada etapa de síntese o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga marca *Eppendorff* modelo 5418. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em água ultrapura.

### 4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Visando otimizar a síntese de nanopartículas de ouro com a semente de *Coffea arabica*, foi realizado um planejamento experimental utilizando o planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  para seleção das variáveis significativas, e em seguida um planejamento fatorial completo  $3^2$  para otimização da síntese de nanopartículas de ouro.

O desenho estatístico de experimentos (DOE) é um procedimento eficiente para o planejamento de experimentos, para que os dados obtidos possam ser analisados para produzir conclusões válidas e objetivas. As duas principais aplicações do projeto experimental são o rastreio, em que os fatores que influenciam o experimento são identificados e otimizados, nas quais as configurações ou condições ideais para uma experiência podem ser encontradas [98,99].

A abordagem usual começa com um projeto de triagem, incluindo todos os possíveis fatores experimentais, para selecionar os fatores significativos, para identificar se a suposição de linearidade é ou não violada e continuar com um projeto de otimização experimental.

#### **4.4.1 Planejamento Fatorial Fracionado**

Como o número de variáveis que afetam a síntese dos nanomateriais são muitas, optou-se por selecionar os principais níveis para otimização a partir de um planejamento fatorial fracionado.

Em um experimento, um ou mais fatores são modificados deliberadamente para observar o efeito das mudanças em uma ou mais variáveis resposta. Quando muitos fatores ou níveis de fatores precisam ser considerados para produzir dados suficientes, haverá uma grande quantidade de experiências repetitivas que precisam ser conduzidos. Isso seria um problema na prática, devido ao grande número de experimentos. Além disso, os métodos com uma variável não levam em conta os efeitos interativos entre fatores. Portanto, um método eficiente de planejamento experimental é fundamental para produzir dados credíveis.

O planejamento fatorial fracionado foi utilizado na seleção das principais variáveis a serem utilizadas na otimização. Sendo assim, o planejamento teve cinco variáveis e os níveis foram selecionados com base em pesquisa prévia sobre a influência de cada variável separadamente.

#### **4.4.2 Planejamento Fatorial Completo**

Após a definição das variáveis mais significativas no processo de síntese, 2 delas foram escolhidas para a otimização. Assim, um planejamento experimental fatorial completo ( $3^2$ ) com 3 níveis e 2 variáveis foi realizado.

O efeito de cada uma das variáveis selecionadas foi analisado em relação à absorbância em 530 nm e feito análise estatística utilizando o *software Statistica* 12 para verificar quais variáveis foram significativas.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

### 4.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-vis

Para obtenção dos dados de absorbância do material sintetizado foi utilizado o espectrofotômetro *Evolution® 300 ThermoScientific* do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo – LABIOM/UFES. A leitura foi feita de 300 a 700 nm com intervalo de 1nm e velocidade de varredura de 240 nm/min. Como branco foi utilizado água ultrapura. O resultado foi expresso por meio de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo *software OriginPro 8.0*.

### 4.5.2 Difração de raios-X

Para a análise de raios-X, o coloide de ouro sintetizado com o extrato vegetal foi concentrado por centrifugação (10.000 rpm, 20 min) e desidratadas por um sistema speed vac (LABCONCO). Um filme da amostra foi colocado em uma lâmina de vidro e a varredura foi realizada na região  $2\theta$ , de  $30^\circ$  a  $90^\circ$ , sendo  $0.01^\circ$  por minuto, com uma constante de tempo de 2 segundos utilizando o difratômetro da Phillips PW 1710 (Cu ka radiação). As medidas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES.

### 4.5.3 Espectroscopia no Infravermelho

Com o objetivo de determinar os grupamentos químicos e identificar as possíveis biomoléculas responsáveis pela biorredução dos íons  $\text{Au}^+$  das NP'sAu, as medidas de Espectroscopia de Infravermelho foram realizadas no modo FTIR (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) do Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES. Para esta análise o coloide metálico sintetizado e uma amostra do extrato vegetal de Café foram desidratadas utilizando o speed vac (LABCONCO).

#### **4.5.4 Espalhamento Raman**

Uma gota do coloide metálico foi seca sobre a superfície de vidro e levados para análise em Espalhamento Raman (ALPHA 300R Confocal Raman Spectrometer) utilizando fonte de laser de 532 nm e realizado varrimento na região do número de onda de 500-3500  $\text{cm}^{-1}$ . O extrato vegetal de Café foi utilizado como controle.

#### **4.5.5 Potencial Zeta**

As medidas foram realizadas no instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrac no Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, de Aracruz/ES utilizando cerca de 2mL do coloide. Os valores foram expressos em mV.

#### **4.5.6 Microscopia eletrônica de transmissão**

Para analisar a forma das nanopartículas foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400, JEOL, USA inc. operado a 120kv. Cerca de 50 $\mu$ L da amostra foi gotejada sobre uma lâmina de vidro até a desidratação parcial. Grade de cobre de 400 mesh contendo um filme de polímero Formvar foram passadas lentamente sobre a amostra. As grades foram deixadas secar a temperatura ambiente por 30 minutos. As imagens foram obtidas em diferentes aumentos (300.000X, 1.000.000X) com o objetivo de obter informações sobre a forma, o tamanho e aglomerações. Para determinação diâmetro médio das partículas, 1000 partículas foram analisadas no *software* Image J.

#### **4.5.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)**

As medidas foram realizadas no instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrac no Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, de Aracruz/ES utilizando cerca de 2mL do coloide.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EXTRAÇÃO

O rendimento em massa dos extratos aquosos e etanólicos e suas respectivas temperaturas são apresentados na Tabela 1 e 2. Levando em consideração ambos os solventes utilizados na extração, observa-se que o extrato aquoso apresentou um rendimento de aproximadamente 30 % e o extrato etanólico foi de cerca de 20%, demonstrando aumento na extração utilizando água ultrapura.

**Tabela 1.** Rendimento em massa dos extratos aquosos.

Extrato de <i>C. arabica</i> 10%	Massa inicial (g)	Fração não dissolvida (g)	Fração dissolvida (g)
25°C	10,000	7,163	2,836
45°C	10,000	7,272	2,727
65°C	10,000	7,343	2,656
85°C	10,000	7,377	2,622

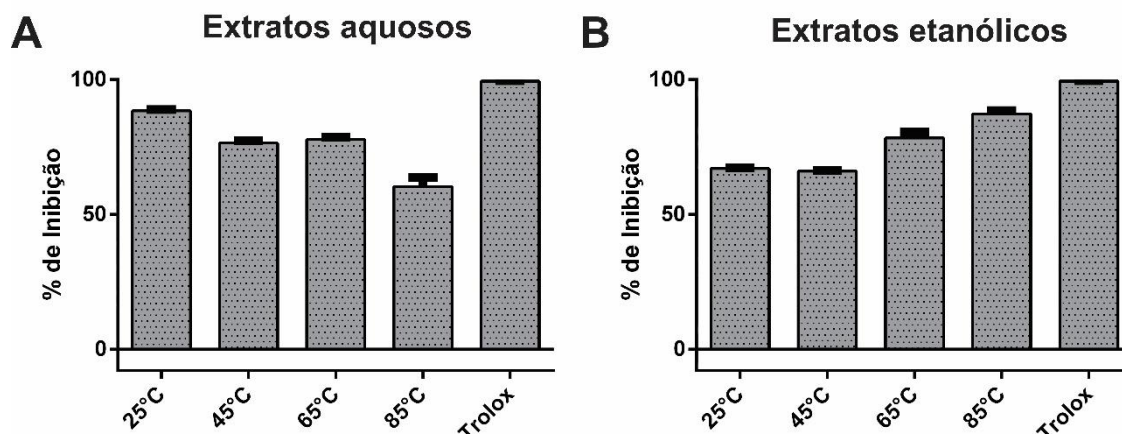
Esta diferença entre os rendimentos das extrações aquosas e etanólicos neste método, deve-se ao fato do etanol e da água terem características distintas, o etanol é uma molécula anfifílica e extrai tanto moléculas com caráter apolar quanto polar, já a água extrai moléculas polares [100]. Possivelmente o extrato aquoso conseguiu extrair maior quantidade de moléculas devido a polaridade da água, obtendo rendimento em massa maior que o extrato etanólico.

**Tabela 2.** Rendimento em massa dos extratos etanólicos

Extrato de <i>C. arabica</i> 10%	Massa inicial (g)	Fração não dissolvida (g)	Fração dissolvida (g)
25°C	10,000	8,356	1,643
45°C	10,000	8,069	1,930
65°C	10,000	7,825	2,174
85°C	10,000	7,683	2,316

Os resultados do ABTS neste estudo demonstram que o método extrativo e a temperatura, influenciaram diretamente as atividades antioxidantes dos extratos, porém é preciso levar em consideração que muitas substâncias são termolábeis justificando assim a perda da sua atividade antioxidante gerada pelo

aquecimento, que pode causar modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas, justificando assim o melhor rendimento do extrato aquoso a 25° C (Figura 4A) [101, 102].



**Figura 4.** ABTS dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) e suas respectivas temperaturas. Abts colocar trolox

Este resultado demonstra que o solvente aquoso é mais seletivo para a extração dos metabólitos presentes nos extratos, estudos anteriores identificaram a presença de taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides glicosilados derivados da quercetina e kaempferol, grupos de metabolismo secundário com caráter mais polar [103].

Analisando os extratos utilizando o etanol (Figura 4B), observa – se que os melhores rendimentos extrativos de moléculas com atividade antioxidante, foram obtidos em maiores temperaturas. Este resultado demonstra que à medida que aumenta a temperatura para a obtenção do extrato final, aumenta a extração das moléculas com atividade antioxidante no café [104]. Quando os compostos são quebrados devido a temperatura, é chamado de degradação térmica, este processo possivelmente ocorreu durante o aquecimento do extrato etanólico, permitindo uma resposta maior da atividade antioxidante pelo método ABTS (Figura 4B).

O calor também é conhecido por aumentar a solubilidade de muitos compostos químicos. Assim, o calor pode funcionar das duas formas simultaneamente para afetar a extração, aceleração das reações químicas e aumentando a solubilidade de certos compostos [105].

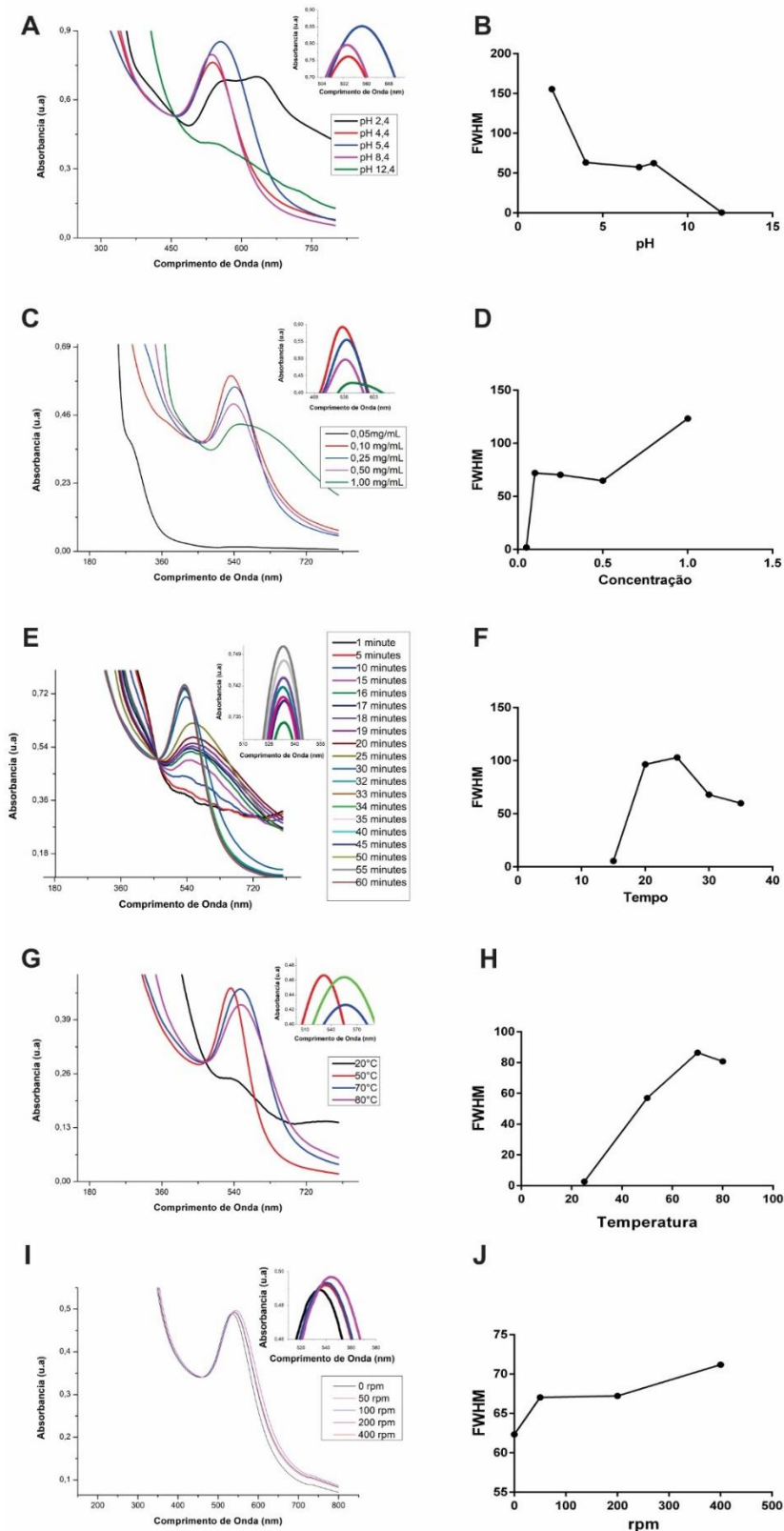


De outro modo, quando fabricamos café em temperatura ambiente ou refrigerada, devemos prolongar o tempo de preparação para obter a "mesma" extração. Onde no processo de extração a frio o tempo de processamento deve ser maior para compensar a temperatura baixa. As moléculas do café exibem uma solubilidade significativamente diminuída na temperatura ambiente na água. Aumentar o tempo de incubação em horas, em vez de minutos, permite a extração máxima dos solúveis. Dito isto, devemos notar que as duas bebidas finais (quente e frio) não devem exibir a mesma composição química. Em particular, a percepção sensorial de amargura e adstringência do café aumentou com a temperatura de preparação [106]. Claro, na realidade a temperatura não pode ser examinada como uma única variável no processo de fabricação de café, tornando assim difícil de estudar.

## 5.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS SEPARADAMENTE, PARA CONSTRUÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

A variação do pH geralmente tem uma grande influência no controle da síntese dos nanomateriais. Para entender melhor o efeito do pH na formação dos nanomateriais, os valores escolhidos para o intervalo de estudo foram cuidadosamente escolhidos. Dois conjuntos de produtos químicos foram utilizados para variar o pH do extrato, NaOH e HCl. Os diferentes valores iniciais de pH da solução de extrato foram ajustados para 2,4, 4,4, 5,4, 8,4 e 12,4 respectivamente para cada extrato.

Os experimentos realizados nesta faixa de pH (2,4-12,4) demonstraram que o pH ácido e alcalino foi relativamente prejudicial para a dispersão e estabilidade, quando este potencial está em um intervalo igual ou abaixo de 2,4 e acima ou igual a 12,4 causa uma instabilidade no sistema de síntese levando a polidispersão NP's. A resposta da largura de banda a meia altura apresentou a melhor resposta de monodispersão quando o pH do café foi 5,4 que corresponde ao pH natural do extrato preparado. A diminuição e o aumento do pH natural representaram uma perda de monodispersão das NP's (Figura 5AB).



**Figura 5.** Análise isolada da influência das variáveis no processo de biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando o extrato de *Coffea arabica*. Gráficos apresentando a influência das variáveis pH (A,B); Concentração (C,D); Tempo (E,F); Temperatura (G,H); Agitação (I,J).

A variação da concentração do extrato utilizado foi de 0,05mg/mL, 0,10mg/mL, 0,25mg/mL, 0,50mg/mL e 1,00mg/mL todos extratos foram preparados em pH 5,4. É bem sabido que aumentar ou diminuir a concentração durante a síntese, eventualmente influenciará os produtos resultantes. Na investigação do efeito da concentração durante a síntese foi observado que concentrações abaixo ou igual a 0,05mg/mL não apresenta formação de nanomateriais no tempo estabelecido e concentração igual ou maior que 1,00mg/mL apresentou nanopartículas polidispersas (Figura 5C). Quando a concentração durante a síntese é de 0,5mg/mL há melhorá monodispersão das NP's , comparando com as outras condições testadas durante a experimentação (Figura 5D). Isso implica que um bom controle durante a síntese pode ser utilizado para obter controle direto sobre as NP's. Observando o espectro de UV-Vis do coloide com concentração de 0,05mg/mL pode ter como explicação a ausência de pico em 530nm devido o diâmetro abaixo da detecção do UV-Vis, gerando um espectro como pode ser revelado na Figuras 5C. O tempo estabelecido não foi suficiente para o crescimento dos nanomateriais em concentrações igual ou abaixo de 0,05mg/mL. Possivelmente o crescimento acontecerá estabelecendo um tempo maior durante a síntese.

Para investigar a influência do tempo durante a síntese, o processo ocorreu na concentração de 0,5mg/mL e o valor de pH de 5,4 em um intervalo de tempo 1 min à 60minutos. A Figura 5 (E;F) mostra a variação do tempo durante a síntese e pode notar-se que o tempo de crescimento é um fator importante para o controle da síntese. Os resultados indicaram que o crescimento contínuo e constante das nanoestruturas procede até os 35 minutos, após esse tempo não apresenta modificações , ou seja, o sistema estaria no estágio de equilíbrio.

O efeito da temperatura durante a síntese também foi investigado. O intervalo de temperatura estudada foi de 20°C à 80°C usando uma concentração de 0,5mg/mL, pH = 5,4 e tempo de 35 minutos. A temperatura de 20°C apresentou o espectro de UV-Vis do coloide com uma largura de banda a meia altura baixa, devido o diâmetro dos nanomateriais no coloide está abaixo da detecção do UV-Vis, gerando um espectro como pode ser revelado na Figura 5 (G;H). As nanopartículas a temperaturas igual ou acima de 80 °C apresentou uma maior polidispersão (Figura 5H).

Outra variável estudada foi a agitação (rpm) durante a síntese, o intervalo dessa variável foi de 0 rpm a 400rpm, mas essa variável não apresentou modificações significativas durante a experimentação (Figura 5 (I;J)). A partir da discussão acima, podemos dizer que o pH, concentração, tempo e temperatura controlam a morfologia dos nanomateriais estudados ao ajustar esses parâmetros, podemos compreender e controlar o crescimento das NP's.

### 5.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1 Planejamento Fatorial Fracionado

Os níveis de cada uma das variáveis e os intervalos de estudo foram definidos de modo a abranger a resposta mínima e máxima de cada variável (Figura 5). As sínteses químicas foram realizadas conforme o estudo da influência das variáveis e o espectro de absorção UV-Visível foram realizados para caracterização prévia da amostra. A Tabela 3 abaixo apresenta as variáveis e os valores dos intervalos de cada uma delas.

**Tabela 3.** Valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.

Variáveis	Intervalo de Estudo	
	Baixo (-)	Alto (+)
<b>Tempo (min)</b>	20	35
<b>Temperatura (°C)</b>	50	70
<b>pH</b>	2	9
<b>Concentração (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	0,05	0,5
<b>Agitação (rpm)</b>	0	400

Para melhor compreensão das etapas do planejamento fatorial fracionado, a Tabela 4 abaixo apresenta cada uma das 16 sínteses químicas e suas respectivas condições.

**Tabela 4.** Matriz do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de *Coffea arabica*.

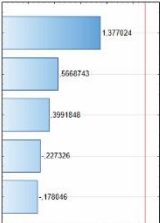
Nº de ensaio	Variáveis estudadas				
	Tempo (min)	Concentração (mg/mL)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
1	20	0,05	2	50	0
2	35	0,05	2	50	400
3	20	0,5	2	50	0
4	35	0,5	2	50	400
5	20	0,05	9	50	0
6	35	0,05	9	50	400
7	20	0,5	9	50	0
8	35	0,5	9	50	400
9	20	0,05	2	70	0
10	35	0,05	2	70	400
11	20	0,5	2	70	0
12	35	0,5	2	70	400
13	20	0,05	9	70	0
14	35	0,05	9	70	400
15	20	0,5	9	70	0
16	35	0,5	9	70	400

As variáveis estudadas foram tempo (min), temperatura (°C), pH, concentração do extrato (mg.mL<sup>-1</sup>) e agitação (rpm) tendo como resposta o comprimento de onda máximo ( $\lambda$  máx), largura de banda a meia altura (FWHM), area abaixo da curva (600 a 800nm), delta lambda ( $\Delta \lambda$ ) e absorbância máxima.

Os efeitos de cada uma das variáveis selecionadas foram analisados em relação às respostas de largura de banda a meia altura (FWHM), area abaixo da curva, delta lambda ( $\Delta \lambda$ ) e absorbância máxima. Utilizando como ferramenta o programa computacional STATISTICA versão 10.0. Os dados de entrada usados foram resultados obtidos pelo espectro do UV-vis das amostras produzidas. A análise de variância (ANOVA) dos dados foi realizada, sendo os valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os valores mais significativos das variáveis independentes foram descobertos através da realização da análise do ANOVA, sendo assim possível descobrir qual resposta estaria causando mais influência durante o processo de síntese. A fim de verificar a influência das variáveis apresentadas na Tabela 5, a análise de variância (ANOVA) demonstra que a absorbância máxima, teve a resposta mais significativa para o pH e temperatura durante o processo de síntese de nanomateriais utilizando o extrato de café.

O diagrama de Pareto (Tabela 5) é apresentado a fim de permitir uma fácil visualização e identificação das variáveis que afetaram a síntese de nanopartículas metálicas ( $p < 0,05$ ). As demais variáveis podem ser desprezadas, uma vez que o efeito calculado pode ser negligenciado com 95 % de confiança.

**Tabela 5.** ANOVA e gráfico de Pareto para síntese de nanopartículas de ouro utilizando planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  analisados em relação às respostas de: Largura de banda a meia altura (FWHM) (A, B); Delta lambda ( $\Delta \lambda$ ) (C, D); Área abaixo da curva (E, F); Absorbância máxima (G, H).

FWHM	A	VARIÁVEIS	SS	DF	MS	F	P	B		p=,05
		TEMPO (min)	33,03611	1	33,03611	0,0317	0,862242			
		TEMPERATURA (°C)	334,888	1	334,888	0,321346	0,583299			
		pH	1976,102	1	1976,102	1,896196	0,198546			
		CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	166,0634	1	166,0634	0,159348	0,698149			
		AGITAÇÃO (RPM)	53,8549	1	53,8549	0,051677	0,82475			
		ERROR	10421,4	10	1042,14					
		TOTAL SS	12985,35	15						

Δ λ	C	VARIÁVEIS	SS	DF	MS	F	P	D		p=,05
TEMPO (min)	612,5625	1	612,5625	0,744927	0,40831					
TEMPERATURA (°C)	473,0625	1	473,0625	0,575283	0,465667					
pH	473,0625	1	473,0625	0,575283	0,465667					
CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	264,0625	1	264,0625	0,321122	0,583428					
AGITAÇÃO (RPM)	22,5625	1	22,5625	0,027438	0,871738					
ERROR	8223,125	10	822,3125							
TOTAL SS	10068,44	15								
Área abaixo da curva	E	VARIÁVEIS	SS	DF	MS	F	P	F		p=,05
TEMPO (min)	613491	1	613490,7	0,999918	0,340912					
TEMPERATURA (°C)	710735	1	710735,2	1,158415	0,307075					
pH	509209	1	509209,0	0,829951	0,383721					
CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	657758	1	657757,7	1,072068	0,324868					
AGITAÇÃO (RPM)	638025	1	638025,3	1,039907	0,331880					
ERROR	6135410	10	613541,0							
TOTAL SS	9264628	15								
Abs. máxima	G	VARIÁVEIS	SS	DF	MS	F	P	H		p=,05
TEMPO (min)	0,000504	1	0,000504	0,022778	0,883036					
TEMPERATURA (°C)	0,027861	1	0,027861	1,260384	0,28781					
pH	0,48818	1	0,48818	22,08453	0,000842					
CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	0,008653	1	0,008653	0,391463	0,545545					
AGITAÇÃO (RPM)	0,001876	1	0,001876	0,084877	0,776747					
ERROR	0,221051	10	0,022105							
TOTAL SS	0,748124	15								

\* As variáveis significativas são apresentadas em vermelho; SS – Soma dos quadrados; DF – Grau de Liberdade; MSQ – Quadrados das Médias; F – Teste F; P – Valor de p.

O diagrama de Pareto (Tabela 5) é apresentado a fim de permitir uma fácil visualização e identificação das variáveis que afetaram a síntese de nanopartículas metálicas. A significância dos dados é avaliada quando seu valor de p é menor que 0,05. Nos resultados a variável resposta absorbância máxima demonstrou pelo Anova e Pareto (Figura 6A), que o resultado mais próximo de zero seria a temperatura e o pH, sendo essas as variáveis que mais causaram alterações no processo de síntese. Para um nível de confiança de 95%, o valor

de  $p$  deve ser inferior ou igual a 0,05 para que o efeito seja estatisticamente significativo. O gráfico de Pareto é utilizado para determinar a magnitude e a importância dos efeitos. No gráfico de Pareto, as barras indicam os efeitos das variáveis e as que cruzam a linha de referência que está em 0,05 são estatisticamente significativas. Desta forma, os parâmetros: Temperatura e pH foram as variáveis que mais interferiram na etapa de triagem. Por conseguinte, foram selecionados para otimização utilizando o planejamento fatorial completo.

### **5.3.2 Planejamento Fatorial Completo**

O planejamento fatorial fracionado permitiu identificar os fatores que afetam a resposta. Uma vez que os fatores importantes foram identificados, nesse caso a temperatura e o pH, o próximo passo é determinar as configurações desses fatores que resultaram no valor ideal da resposta.

As sínteses para o planejamento fatorial completo foram realizadas conforme os resultados obtidos pela análise estatística das variáveis trabalhadas (Tabela 5), e o espectro de UV-visível foi realizado para caracterização prévia da amostra (Figura 7).

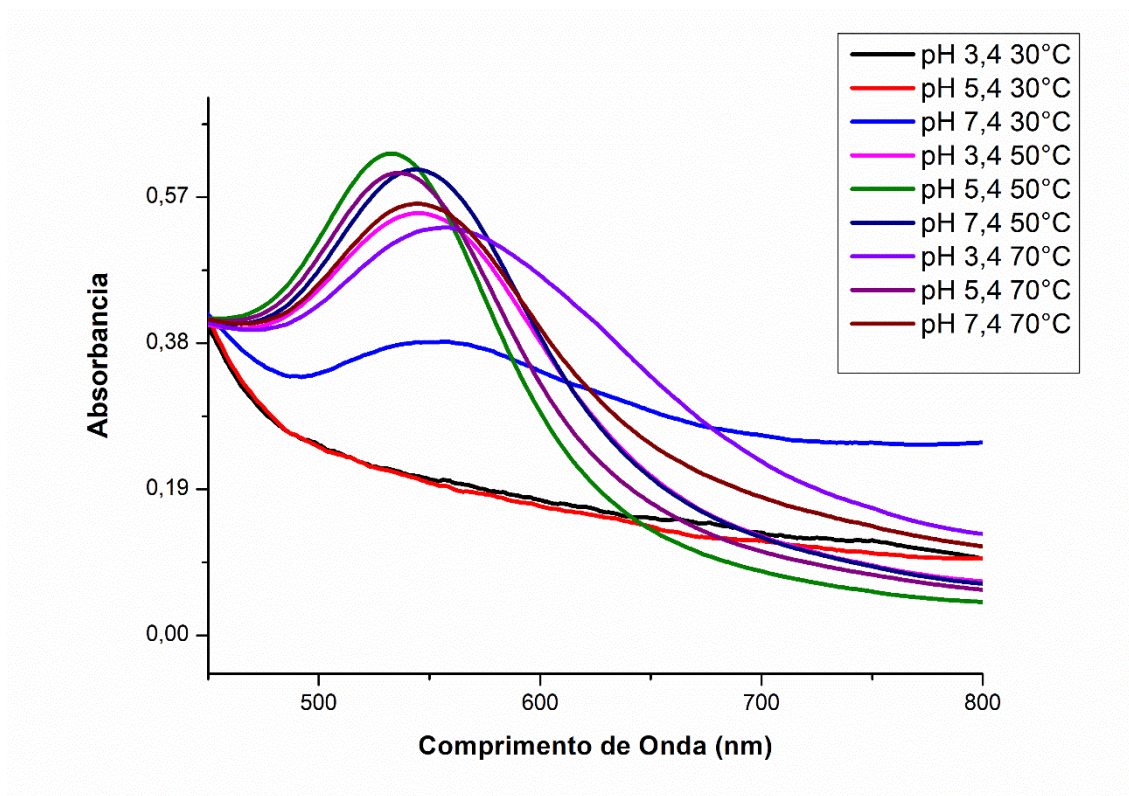
Visando avaliar o melhor processo de redução foi realizado um planejamento fatorial completo  $3^2$  com três pontos centrais. A Tabela 6 apresenta as condições experimentais e os resultados de cada síntese. As variáveis estudadas foram pH e temperatura do extrato, tendo como resposta a absorbância máxima.



**Tabela 6.** Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro, com extrato de *Coffea arabica*.

n° de ensaio	Variáveis estudadas	
	pH	Temperatura (°C)
1	3,4	30
2	5,4	30
3	7,4	30
4	3,4	50
5	5,4	50
6	7,4	50
7	3,4	70
8	5,4	70
9	7,4	70
10	5,4	50
11	5,4	50

A absorbância máxima foi utilizada como variável resposta, visto que para nanopartículas metálicas, este parâmetro está relacionado com o rendimento na formação das nanopartículas num sistema coloidal. A Figura 6 abaixo apresenta os espectros de absorção de UV-Visível das 11 sínteses químicas de acordo o planejamento fatorial completo e como observado indica a formação de nanopartículas de ouro com a variação na absorbância máxima, pois se observa alterações na altura do pico plasmônico referente à síntese de nanopartículas de ouro.



**Figura 6.** Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial completo utilizando extrato de café como agente redutor.

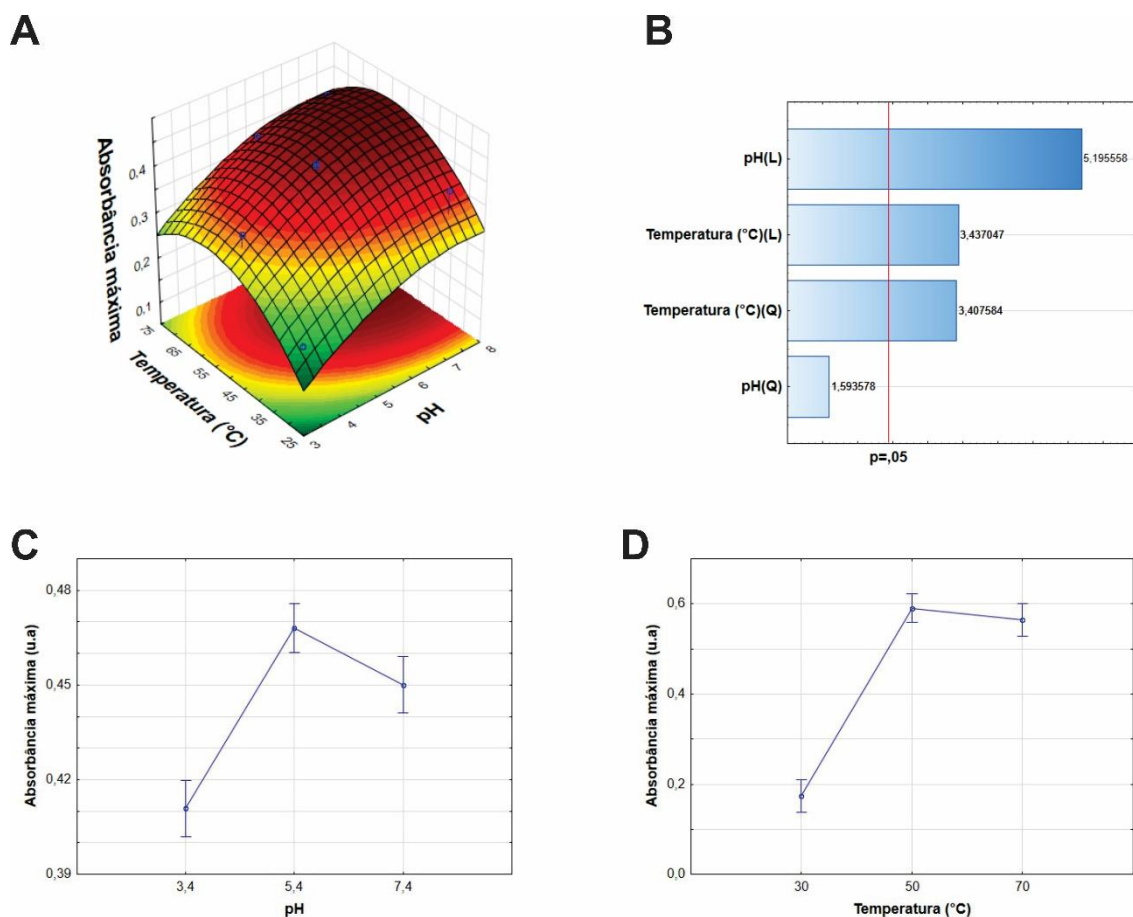
A avaliação do melhor processo de redução foi realizada utilizando um planejamento fatorial completo  $3^2$  com três pontos centrais. Como se verifica na Tabela 7, as variáveis estudadas foram pH e temperatura do processo de síntese, tendo como resposta a absorbância máximo, que é apresentada juntamente com as condições experimentais e os resultados.

**Tabela 7.** Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de café. A variável resposta utilizada foi o Absorbância máxima.

<b>Condições de Reação – Síntese com Extrato de <i>Coffea arabica</i></b>			
<b>n° de ensaio</b>	<b>Variáveis estudadas</b>		<b>Resposta</b>
	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Abs. Máximo</b>
<b>1</b>	3,4	30	0,20245
<b>2</b>	5,4	30	0,18745
<b>3</b>	9,4	30	0,38238
<b>4</b>	3,4	50	0,54951
<b>5</b>	5,4	50	0,62677
<b>6</b>	9,4	50	0,6062
<b>7</b>	3,4	70	0,53067
<b>8</b>	5,4	70	0,60161
<b>9</b>	9,4	70	0,56172
<b>10</b>	5,4	50	0,65953
<b>11</b>	5,4	50	0,6085

A figura 7 apresenta o gráfico de superfície resposta do planejamento fatorial completo (figura 7A), diagrama de Pareto (Figura 7B), influência de cada uma das variáveis analisadas (Figura 7CD).

O gráfico de superfície resposta (Figura 7A) mostra a interação entre as duas variáveis analisadas (temperatura e pH) para obter a resposta ótima. O valor ótimo da resposta pode ser um valor máximo ou um valor mínimo, dependendo do produto ou processo em questão. Por exemplo, se a resposta em um experimento for o rendimento de um processo químico, então o objetivo pode ser encontrar as configurações dos fatores que afetam o rendimento para que o rendimento seja maximizado. Por outro lado, se a resposta em uma experiência for o número de defeitos, o objetivo seria encontrar as configurações de fator que minimizem o número de defeitos. As metodologias que ajudam o experimentador a alcançar a meta de resposta ideal são referidas como métodos de superfície de resposta. Esses métodos são usados exclusivamente para examinar a "superfície", ou a relação entre a resposta e os fatores que afetam a resposta.

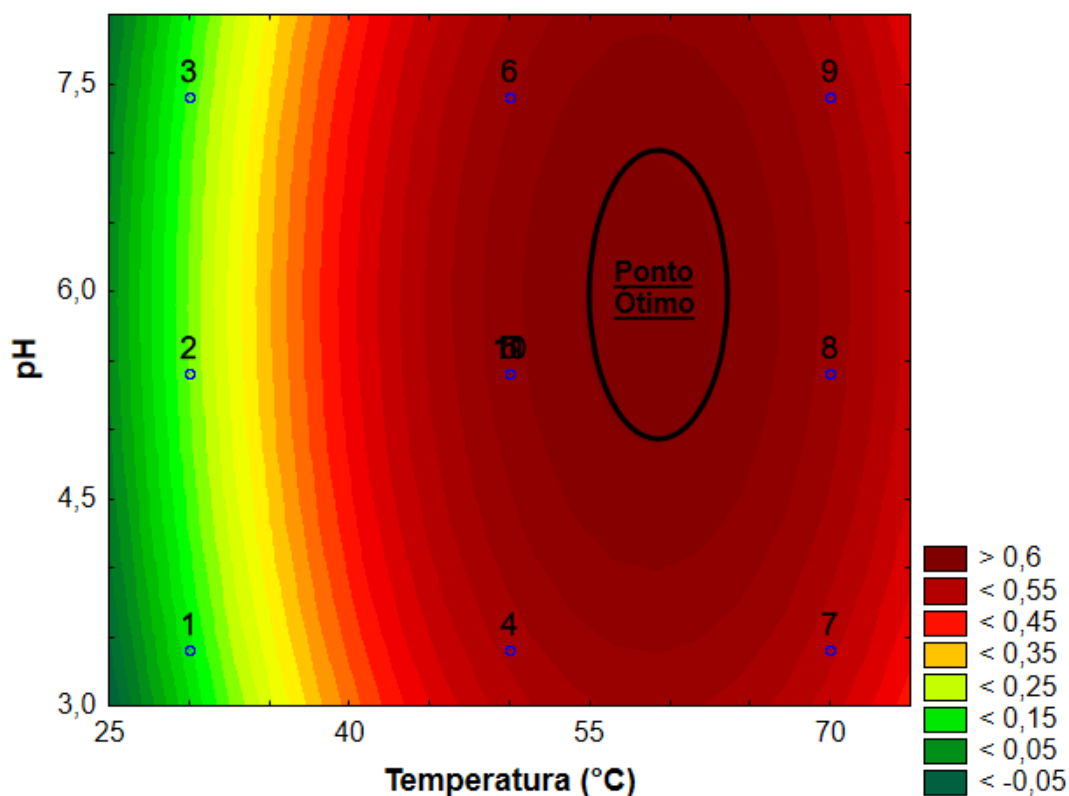


**Figura 7.** Gráfico de superfície resposta das nanopartículas sintetizadas com café e absorbância (530nm) em função das variáveis (A); Digrama de Pareto indicando as variáveis que foram significativas no processo (B); Influência do pH em relação a variável resposta absorbância máxima (C); Influência da temperatura do extrato em relação a variável resposta absorbância máxima (D).

No gráfico de Pareto, a temperatura representa o fator com a maior influência estatisticamente significativa (Figura 7B). Essa resposta pode ser representada devido a temperatura cruzar a linha de referência que está em 0,05. Ao analisarmos a influência do pH, verificamos que a medida que o pH muda de 3,4 para 5,4 ocorre um evidente aumento na absorbância máxima, e ao aumentar o pH para 7,4 ocorre uma pequena diminuição da variável resposta (Figura 7C) e em relação a temperatura observamos que quando alteramos a temperatura de 30 °C para 50°C, ocorre aumento na absorbância máxima e temperatura acima de 50° C, causa uma diminuição baixa na absorbância máxima, como pode ser observado na Figura 7D, onde a temperatura é de 70°C. A partir desses dados podemos inferir que, para esse sistema, em pH 5,4 e temperatura de 50 °C

teremos maiores valores de absorbância máxima, essas condições corresponde ao ponto médio do planejamento fatorial Tabela 6.

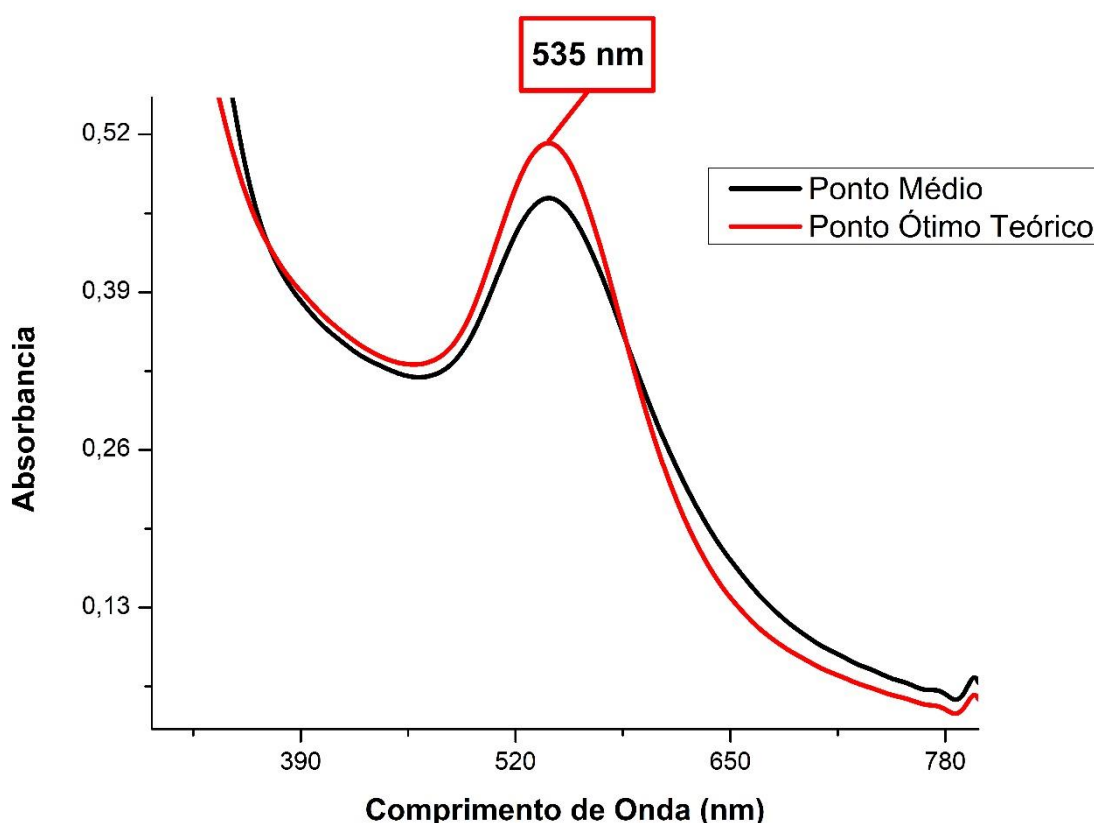
Muitas vezes, o objetivo da pesquisa é identificar condições em que a resposta é ótima, não para caracterizar toda a superfície de resposta. Para tal objetivo, uma estratégia experimental precisa apenas determinar as combinações de fatores que otimizam a resposta. É possível encontrar o rendimento máximo devido os resultados obtidos pelo gráfico de contorno demonstrar representativamente (Figura 8) e os dados retirados pelos espectros (Figura 6) demonstrarem numericamente a melhor resposta (Tabela 8).



**Figura 8.** Gráfico de contorno demonstrando a condição ótima de síntese, utilizando a resposta do planejamento fatorial completo.

Para validar o modelo estatístico utilizado, uma nova síntese de NP'sAu foi realizada com as condições otimizadas previstas (temperatura 57,848°C e pH 8,992) conforme mostradas no gráfico de contorno e na Tabela 8. Os resultados

podem ser visualizados no gráfico de UV-Vis conforme Figura 9. Foi verificado que o ponto ótimo predito possui maiores valores de absorbância máxima e menor largura de banda do que o ponto médio (melhor condição avaliada), confirmando o ajuste do modelo. Pode-se afirmar também que o planejamento estatístico fatorial é uma ferramenta útil para a otimização das variáveis que afetam a síntese verde.



**Figura 9.** . Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro do ponto médio do planejamento fatorial completo e do ponto ótimo.

O objetivo é encontrar a combinação de condições associados à resposta ótima sem avaliar todas as possíveis combinações de fatores da superfície de resposta. Um projeto fatorial completo permitiu encontrar a combinação de pH e temperatura ótimo para obter a melhor resposta (Tabela 8) durante o tratamento experimental.

**Tabela 8.** Combinação de pH e temperatura para obtenção do ponto ótimo teórico

Variáveis	Mínimo	Condição Ótima	Máximo
Temperatura (°C)	30	57,848	70
pH	3,4	8,992	7,4

Vários pontos de resposta foram avaliados durante a comparação entre o ponto médio do planejamento fatorial completo e ponto ótimo estatisticamente. O resultado demonstrou que o ponto ótimo causa melhora na FWHM, absorbância máxima e área abaixo da curva e não causa alteração no lambda máximo (Tabela 9), influenciando positivamente os resultados.

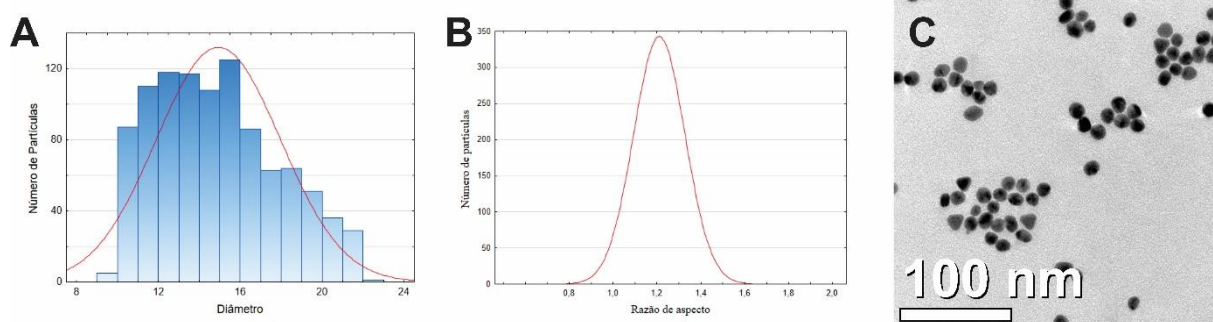
**Tabela 9.** Comparação entre as variáveis resposta do ponto médio e do ponto ótimo teórico.

Ensaio	Respostas			
	FWHM	$\lambda$ maximo	Abs. Máx	Area abaixo da curva
Ponto Médio	71,52629	540	0,71749	14,62047
Ponto Ótimo Teorico	66,4522	540	0,76282	12,83409

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

### 5.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As Nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de café obtiveram diâmetro médio de 13,87 nm conforme contagem de 1000 nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 10A).



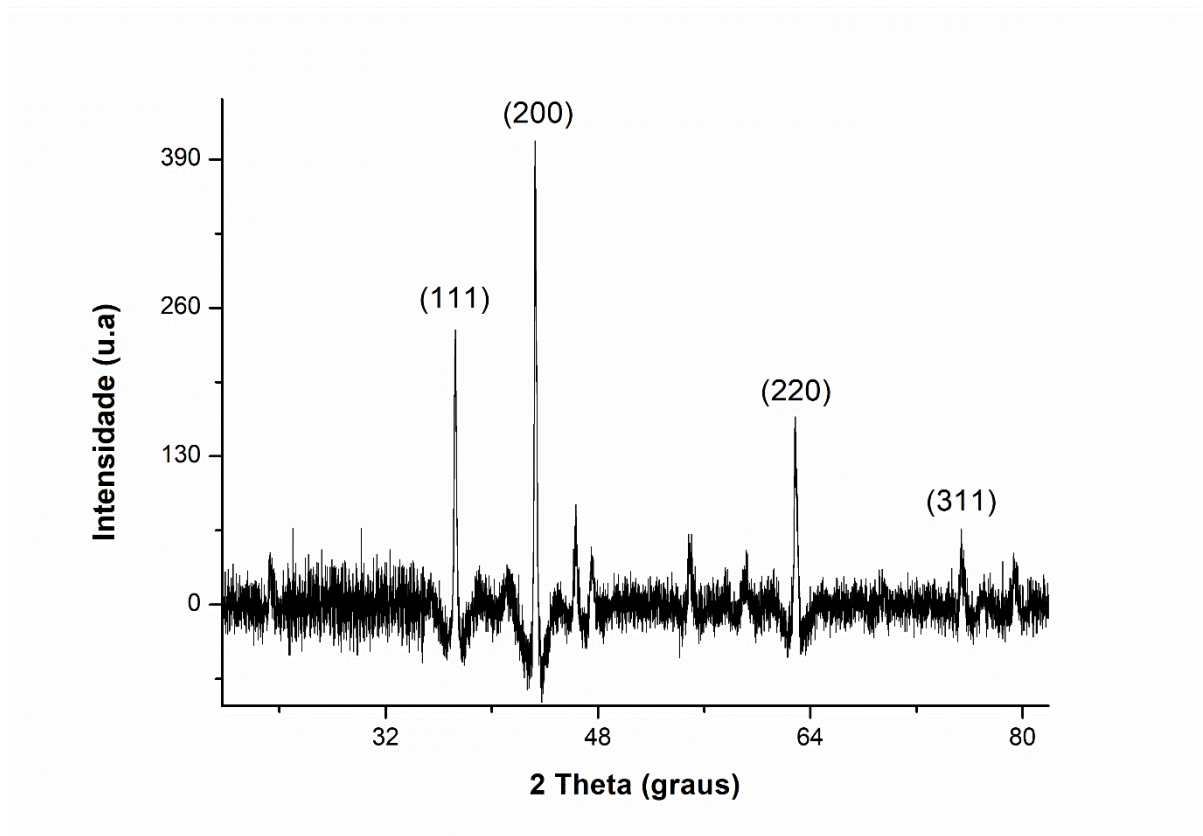
**Figura 10.** Histograma mostrando a distribuição gaussiana de diâmetro (A) e a razão de aspecto (RA) de 1000 partículas obtidas por imagens feitas de microscopia eletrônica de transmissão (B); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (C).

A forma esférica predomina ao observar a imagem de MET dos nanomateriais (Figura 10C), também pode ser verificada a esfericidade das nanopartículas com os dados da razão de aspecto (RA) obtidas pela medição de 1000 nanopartículas obtidas por imagens de MET (Figura 10B). A RA é calculada dividindo o diâmetro maior pelo diâmetro menor. Valores próximos de 1 indicam a esfericidade e valores mais afastado de 1, indicam formas mais alongadas e não esféricas.

#### 5.4.2 Difração de Raios-X (DRX)

A natureza cristalina das AuNP's foi confirmada por análise de DRX. Os quatro picos de difração intensos foram observados a  $2\theta$ , sendo os valores encontrados de  $38,31^\circ$ ,  $44,45^\circ$ ,  $64,64^\circ$  e  $77,73^\circ$ , correspondente ao (111), (200), (220), e (311) de reflexão do ouro metálico cristalino, respectivamente (Figura 11). Um forte pico de difração (200) sugere que este padrão é a orientação predominante de AuNP's. A concentração foi determinada por ICP-MS e o resultados foi de 34,4695 mg/L de Au.





**Figura 11.** Difratoograma de raios-X das NP'sAu.

#### **5.4.3 Espectroscopia no infravermelho**

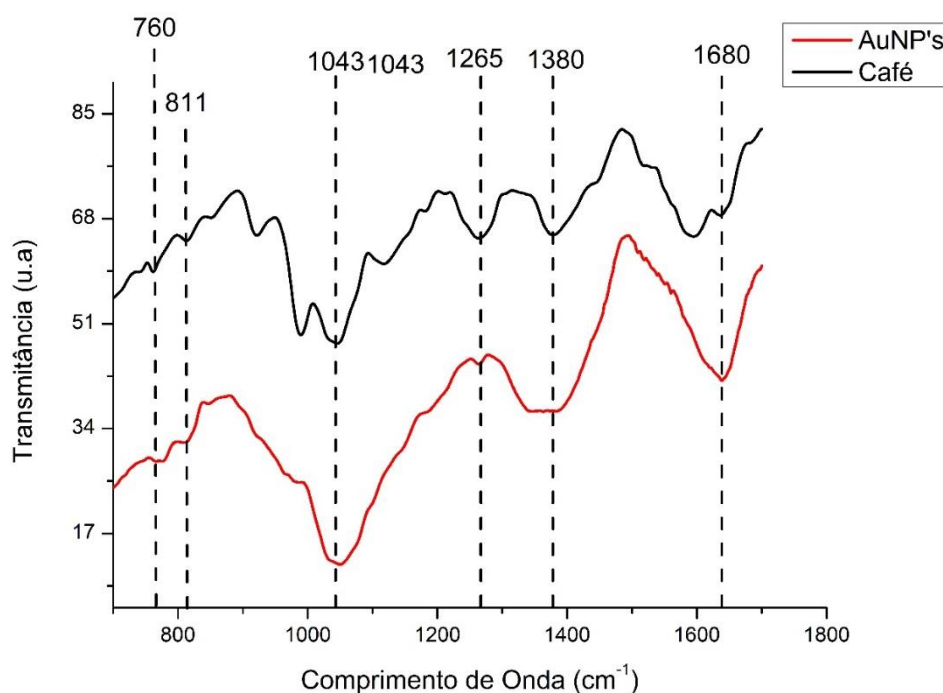
A Figura 12 mostra os espectros de FTIR do extrato do café e das NP's após a redução do  $\text{HAuCl}_4$ , respectivamente. A presença de uma variedade extensa de compostos como hidratos de carbono, minerais, cafeína, proteínas, e lipídios, que em sua maioria absorvem na região de  $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , faz com que as bandas de absorção se sobreponham, dificultando a interpretação dos espectros [107].

As atribuições das absorções da (Tabela 9) podem estar associadas aos ácidos clorogênicos, compostos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, dentre outros componentes específicos de amostras de café.

**Tabela. 10.** Espectros de FTIR das amostras de café Arábica

<b>Bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
1680	Estiramento da ligação C=O de compostos aromáticos aldeído ou cetona
1380	Estiramento da ligação C=C
1265	Dobramento C-H no plano
1043	Deformação C-O
811	Curvatura C-H fora do plano
760	Alongamento C-X (X = F, Cl, Br ou I)

É possível notar visualmente uma diminuição acentuada na absorbância da banda na região de 1743 cm<sup>-1</sup>, indicativa de carbonila de ésteres [108, 109].



**Figura 12.** Espectro de infravermelho do extrato de café e do coloide de NP'sAu.

Nesta abordagem, a presença da banda forte entre 1550 e 1750 cm<sup>-1</sup> em espectros pode ser atribuída à molécula de cafeína, enquanto que uma forte banda de absorção entre 1150 e 1300 cm<sup>-1</sup> é atribuível ao ácido clorogênico [110, 111]. Este novo perfil é possivelmente devido ao processo de redução de oxidação para a formação de Au<sup>0</sup>, que pode ocorrer entre moléculas polifenólicas que reduzem Au<sup>3+</sup> por álcoois fenólicos [113] ou grupos carboxílicos; ou pela

instabilidade térmica de alguns dos componentes do extrato, como ácidos clorogênicos e lactonas [112].

No que diz respeito à sensibilidade térmica da cafeína, alguns estudos demonstraram que não há mudanças significativas devido a processos térmicos extremos, portanto, geralmente é observado um aumento relativo do teor de cafeína após o tratamento térmico de grãos de café [112]. Assim, extrapolando a informação para o presente estudo, essas evidências foram confirmadas. Observa-se que os dois picos possivelmente devido à presença de cafeína, 1638 e 1598  $\text{cm}^{-1}$  (parcialmente sobrepostos), foram menos influenciados pelo processo de síntese em relação a outras regiões, deslocamento de 1638 para 1632 e 1598 para 1520. Em contraste, observou um grande aumento na intensidade dessas bandas após o processo de síntese. O intervalo possivelmente atribuível aos ácidos clorogênicos (1150-1300  $\text{cm}^{-1}$ ) apresentou grandes modificações com redução e ampliação das bandas após a síntese. Os picos absorvidos em frequências vibratórias próximas a 1044  $\text{cm}^{-1}$  também podem estar associados a extensões das ligações C-C presentes na molécula de cafeína e outros alcalóides [113].

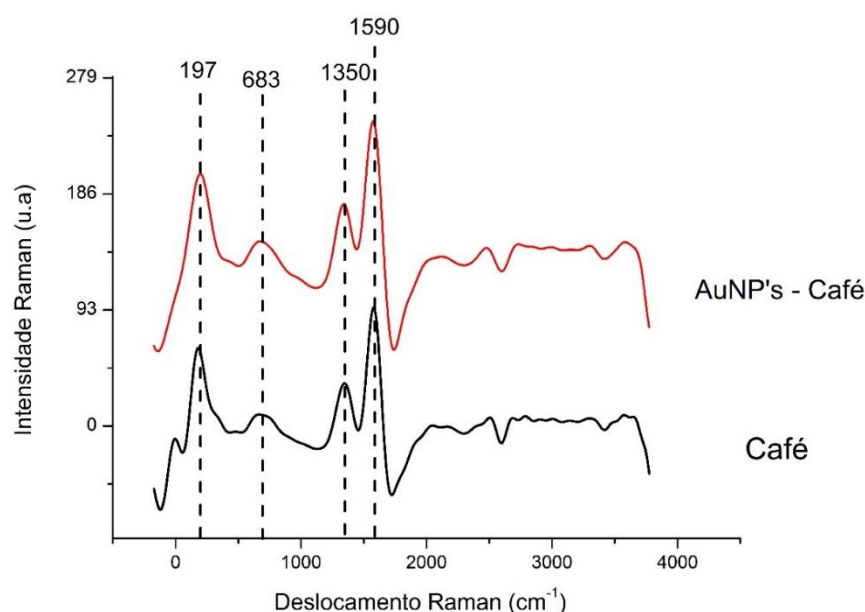
Um estudo desenvolveu um possível mecanismo de reação entre o ouro ( $\text{Au}^{3+}$ ) e o ácido clorogênico mediado pela porção de ácido quínico [113]. Depois de serem oxidados, eles também observaram um espectro "dramaticamente alterado" com deslocamento previsível da banda de OH. A preservação das fortes bandas de absorção entre 1400 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  observadas pelo estudo mencionado não foi observada na análise FTIR deste estudo. Aqui, apareceram bandas altamente condensadas e algumas bandas eliminadas após o processo de síntese nesta região. Essa divergência pode ser atribuída à maior variedade de componentes no extrato vegetal em relação ao estudo comparativo.

O infravermelho consiste em uma radiação de baixa energia e sua principal aplicabilidade é verificar as características dos trechos e deformações causadas por radiação em um determinado produto químico. Assim, embora tenha sido possível observar mudanças em grupos funcionais importantes, estes mostraram as características de qualquer ambiente em que as nanopartículas foram inseridas. Então, a característica real da coordenação química das

nanopartículas não pode ser revelada apenas pelo infravermelho, fato que nos motivou a usar a Espalhamento Raman.

#### 5.4.4 Espalhamento Raman

O espectro Raman obtido mostrou alta intensidade para moléculas irradiadas. Isto é devido à excitação produzida pelo campo elétrico aprimorado da radiação emitida pela superfície metálica, o que permite verificar quais estruturas estão diretamente conectadas às partículas. Ao contrário do espectro infravermelho, os espectros de Raman melhorados pelo efeito fornecido pelas nanopartículas de ouro podem identificar o grupo químico estabilizador sem detectar os outros grupos eventualmente presentes no meio.



**Figura 13.** Espalhamento Raman de superfície nanopartículas de ouro e do extrato de café.

Assim, os espectros produzidos pela dispersão de Raman reduziram o NP'sAu e o extrato de café liofilizado apresentaram modos intensos de alongamento com número de onda próximo de 1350 e 1590  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem a estiramentos de carboxilatos simétricos e assimétricos, respectivamente (Figura 13). A banda em 683  $\text{cm}^{-1}$ , pode pertencer a cafeína, devido outro estudo

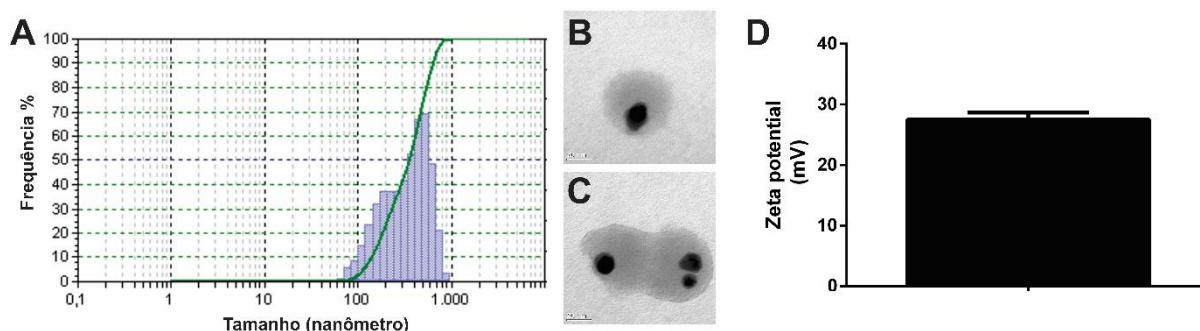
demonstrar um duplo duplete médio para a cafeína visto em 643 e 741  $\text{cm}^{-1}$  [115]. Nos comprimentos de onda menores, especialmente em 197 nm, ocorria o problema de queima do café, sob ação do laser. Isto também é um problema para a análise em Raman, visto que é importante não se destruir a amostra para obtenção dos resultados confiáveis.

Estes resultado vem confirmar que os componentes do extrato esta criando uma espécie de camada de revestimento, funcionalizando as NP's.

#### **5.4.5 Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta**

A Figura 10A representa o diametro das nanopartículas de ouro utilizando o extrato de café, enquanto a Figura 14A mostra nanopartículas com uma escala de diâmetro diferente. Esse resultado ocorre devido a dispersão de luz dinâmica ser empregada para medir o diâmetro hidrodinâmico das suspensões de nanopartículas. Os valores diferentes dos mesmos nanomateriais é explicado pela nuvem formada por moléculas provenientes do extrato vegetal, a ligação dessas moléculas a superfície do nanomaterial gera um diâmetro hidrodinâmico maior. É possível visualizar o extrato no entorno das partículas, como resultado da contrastação negativa prévia com acetato de uranila (Figura 14(B;C)). Esse procedimento foi realizado com o intuito de comprovar visualmente a adsorção do extrato. A a diferença entre o diâmetro médio obtido por microscopia eletrônica de transmissão ( em torno de 14 nm) e por DLS (em torno de 500 nm) leva à confirmação da adsorção, visto as diferenças devido ao raio hidrodinâmico, como pode ser visto na Figura 14(B;C).

O resultado do potencial zeta apresenta a estabilidade do coloide que está diretamente relacionada ao potencial de superfície das nanopartículas que sofre influência das mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão [116]



**Figura 14.** Gráfico de DLS das nanopartículas em função da frequência de tamanho (A). Imagem obtidas após a contrastação do material com acetato de uranila, sendo possível observar a presença do extrato no entorno das partículas, confirmando a resposta do DLS (B, C). Potencial zeta da dispersão da condição ótima de síntese (D).

As AuNP's sintetizadas com o extrato de café na condição ótima, apresentou um potencial zeta de aproximadamente +28 mV (Figura 15D). Este potencial demonstra que as nanopartículas possuem instabilidade incipiente [117]. Uma explicação para o valor positivo do potencial zeta das partículas protonadas é a adsorção de biomoléculas protonadas.

#### 5.4.6 Estudo de estabilidade das nanopartículas

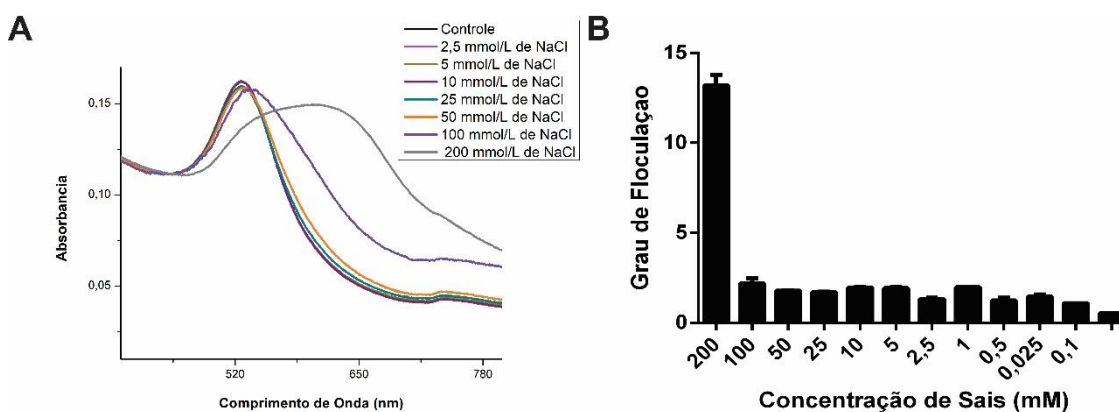
Em seguida, investigamos a estabilidade pelo parametro de floculação das nanopartículas de Au sintetizadas com café. Sendo assim, o efeito do pH e do NaCl foi avaliado sobre as nanopartículas funcionalizadas com o extrato de café. Existe uma grande importancia em fazer esses ensaios, devido os testes biologicos envolverem alterações de pH e sais do meio para executar o teste de interesse.

Para o ouro coloidal num meio aquoso, isto ocorre em torno de 520 nm. No entanto, se as partículas coloidais agregarem tal que a distância entre as esferas de agregação torne-se pequenas em comparação com o seu raio, ressonâncias adicionais ocorrerão em comprimentos de onda maiores do que partículas individuais [118].

Isto resulta em um deslocamento para o vermelho e um alargamento do espectro de absorção. Com base nesta observação, um "parâmetro de floculação" foi

definido por Weisbecker [119] e mais tarde modificado por Maya [120] como a integral do espectro de absorção entre 600 e 800 nm, como uma medida semi-quantitativa da agregação.

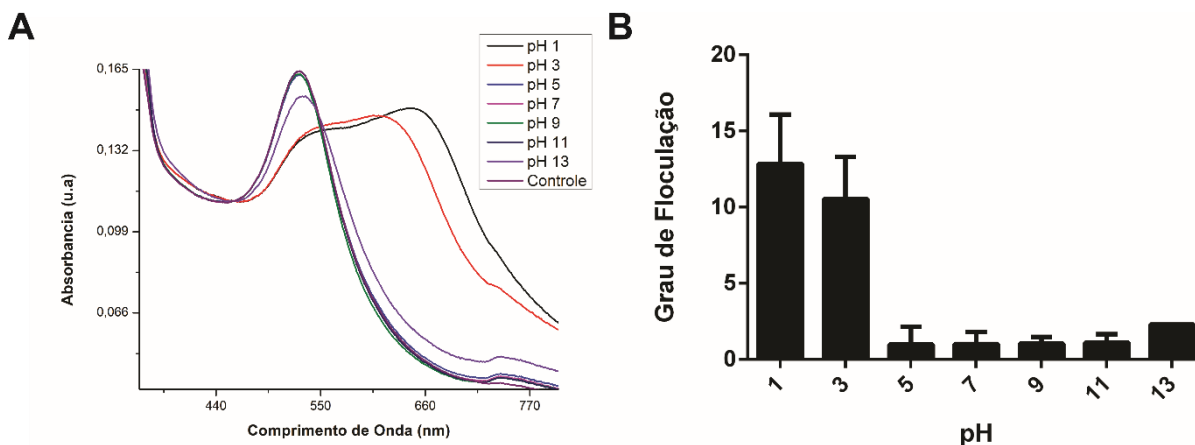
A solução de NaCl foi utilizada em determinadas concentrações conforme a Figura 15B, para estudarmos seu comportamento de floculação. As nanopartículas de ouro de aproximadamente 14 nm que apresenta aumento da área entre 600 e 800 nm Figura 15A, quando a concentração de sal do coloide é de 200 mmol/L Figura 15B. Devido ao efeito de triagem do NaCl, a repulsão eletrostática das nanopartículas de Au é minimizada para causar floculação, o que acompanhou o deslocamento da banda de ressonância plasmática de 524 para 691 nm em 200 mmol/L Figura 15A. O aumento da concentração de NaCl para 200 mmol/L é demonstrado claramente pelo gráfico de UV-vis, visto que houve o deslocamento do  $\lambda$  máximo. Isso mostra que os dados apresentam concordância entre si, pois o aumento do  $\lambda$  máximo é indicativo de redução da estabilidade, conforme apresentando na Figura 15A. Tais dados concordam com os ensaios feitos nas mesmas condições em análise de UV-vis.



**Figura 15.** Espectro de absorção mostrando o coloide de NP'sAu com extrato de café na formulação otimizada, em diferentes concentrações de NaCl (A). Gráfico demonstrando o grau de floculação, a partir do aumento da área entre 600 e 800 nm (B).

Já em relação à variação de pH, quando o meio coloidal está com pH 1 e 3, ou seja, mais acidificado resultaram em maior instabilidade do sistema coloidal,

indicando maior área embaixo da curva no intervalo de 600 e 800nm por levarem a maior agregação das partículas (Figura 16 A) .



**Figura 16.** Espectro de absorção mostrando o coloide de NP'sAu com extrato de café na formulação otimizada, em diferentes pH (A). Gráfico demonstrando o grau de floculação, a partir do aumento da área entre 600 e 800 nm (B).

As NP'sAu permaneceram estáveis na faixa de pH avaliada de 5 a 13, conforme evidenciado pelo parâmetro de floculação (Figura 16B). A instabilidade apresentada pelos demais pHs (1 e 3) pode ser explicada pelo fato de que o pKa da superfície metálica ser alterada nesse intervalo de pH, assim, a repulsão eletrostática entre partículas nessa faixa de pH é reduzida

## 6. CONCLUSÕES

Um conjunto de experimentos avaliando o tipo de solvente e temperatura foi realizado e a extração aquosa de sementes verdes de Coffea arabica a 25 °C apresentou maiores valores de atividade antioxidante (88,05) e por isso foram utilizadas para a síntese de nanopartículas de ouro.

Um estudo detalhado envolvendo cinco variáveis (tempo, temperatura, agitação, pH e concentração dos reagentes) foi realizado com um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  sendo possível identificar as variáveis que mais influenciaram no



processo de síntese verde de NP'Au com extrato de *Coffea arabica*, sendo elas a temperatura e o pH.

Com o intuito de otimizar as condições reacionais, um planejamento fatorial completo  $3^2$  foi realizado e possibilitou a determinação dos valores ótimos para a síntese de NP's com alto rendimento. Uma reação com os valores ótimos preditos foi realizada em bancada e os nanomateriais sintetizados apresentaram-se monodispersos, quase-esféricos (RA ~1,17) e com boa estabilidade (+28 mV). Além disso, foi possível comprovar a adsorção do extrato de *Coffea arabica* na superfície das NP'Au, utilizando diferentes técnicas como MET, DLS, FTIR e Raman. Visando aplicações em sistemas biológicos, o parâmetro de floculação foi avaliado e as NPs mostraram se estáveis em uma ampla faixa de pH (5 a 13) e força iônica (0,05 a 100 mmols.L<sup>-1</sup> NaCl)

Por fim, a reprodutibilidade alcançada com os resultados deste trabalho possibilita a síntese controlada e de alto rendimento de nanopartículas metálicas com extratos vegetais, abrindo assim, novas perspectivas para um largo espectro de aplicações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kimling, J.; Maier M.; Okenve, B.; Kotaidis, V. ; Ballot, H.; Plech. A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *The Journal of Physical Chemistry*. 2006; 110 (32): 15700–15707.
- [2] Cao, Y.C.; Jin, R.; Mirkin, C.A. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection. *Science*. 2002; 297: 1536-1540.
- [3] Klar, T.; Perner, M.; Grosse, S.; Plessen, G.; Spirk, W.; Feldmann J. Surface-Plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles. *Physical Review Letters*. 1998; 80 (19): 4249.

- [4] Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S.V.; Zolfaghari, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2014; 9(6): 385–406.
- [5] Narayanan, K.B.; Sakthivel, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2010; 22 (156): 1–13.
- [6] Gan, P.P.; Ng S.H.; Huang Y.; Li S.F. Green synthesis of gold nanoparticles using palm oil mill effluent (POME): A low-cost and eco-friendly viable approach. *Bioresource Technology*. 2012; 113: 132–135.
- [7] Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S.L. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2003; 125 (46): 13940–13941.
- [8] Narayanan, S.; Sathy, B.N.; Mony, U.; Koyakutty, M.; Nair, S.V.; Menon, D. Biocompatible Magnetite/Gold Nanohybrid Contrast Agents via Green Chemistry for MRI and CT Bioimaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2012; 4(1): 251–260.
- [9] Dubey, J.P.; Lindsay, D. S.; Lappin, M. R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2009; 39: 1009-1034.
- [10] Moazeni, M.; Rashidi, N.; Shahverdi AR, Noorbakhsh F, Rezaie S. Extracellular Production of Silver Nanoparticles by Using Three Common Species of Dermatophytes: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. *Iranian Biomedical Journal*. 2012; 16(1):52-58.
- [11] Chowdhury, S.; Basu, A.; Kundu, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale Research Letters*. 2014; 9(1):365-376.

- [12] Kulkarni, N.; Muddapur, U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *Journal of Nanotechnology*. 2014; 1-8.
- [13] Singaravelu, G.; Arockiamary, J.S.; Kumar, V.G.; Govindaraju K. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007; 57: 97–101.
- [14] Lengke, M.F.; Fleet, M.E.; Southam G.. *Langmuir*. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Filamentous Cyanobacteria from a Silver(I) Nitrate Complex. *Langmuir*. 2007; 23(5): 2694–2699.
- [15] Rautaray, D.; Ahmad, A.; Sastry, M. J. Biosynthesis of CaCO<sub>3</sub> Crystals of Complex Morphology Using a Fungus and an Actinomycete. *Journal of the American Chemical Society*. 2003; 125 (48): 14656-14657.
- [16] Anshup, A.; Venkataraman, J.S.; Subramaniam, C.; Kumar, R.R.; Priya, S.; Kumar, T.R.; Omkumar, R.V.; John. A.; Pradeep, T. Growth of Gold Nanoparticles in Human Cells. *Langmuir*. 2005; 21 (25): 11562-11567.
- [17] Zhang, X.F.; Liu, Z.G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17 (9):1534-1568.
- [18] Das, R.K.; Brar, S.K. Plant mediated green synthesis: modified approaches. *The Royal Society of Chemistry*. 2013; 5(21):10155-62.
- [19] Narayanan, K. B.; Sakthivel, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototropic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011; 169 (2): 59-79.
- [20] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951; 11: 55–75.

- [21] Deraedt, C.; Salmon, L.; Gatard, S.; Ciganda, R.; Hernandez, R.; Jaime Ruiza, J.; Astruc, D. Sodium borohydride stabilizes very active gold nanoparticle catalysts. *Chemical Communications*. 2014; 50: 14194-14196.
- [22] Khan, Z.; Singh, T.; Hussain, J. I.; Hashmi, A.A. Au(III)–CTAB reduction by ascorbic acid: Preparation and characterization of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013; 104 (1): 11-17.
- [23] Ankamwar, B. Biosynthesis of gold nanoparticles (Green-Gold) using leaf extract of *Terminalia catappa*. *E-Journal of Chemistry*. 2010; 7(4): 1334-1339.
- [24] Zhou, Y.; Lin, W.; Huang, J.; Wang, W.; Gao, Y.; Lin, L.; Li, Q.; Lin, L.; Du, M. Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Foliar Broths: Roles of Biocompounds and Other Attributes of the Extracts. *Nanoscale Research Letters*. 2010; 5(1):1351–1359.
- [25] Salunke, G.R.; Sougata Ghosh, S.; Kumar, S.; Khade, S.; Vashisth, P.; Kale, T.; Chopade, S.; Pruthi, V.; Kundu, G.; Bellare, J.R.; Chopade, B.A. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *International Journal of Nanomedicine*. 2014; 9(1): 2635–2653.
- [26] Baghizadeh, A.; Ranjbar, S.; Gupta, V.K.; Asif, M.; Pourseyed, S.; Karim, M.J.; Mohammadinejad, R. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. *Journal of Molecular Liquids*. 2015; 207: 159–163.
- [27] Huang, K.C.; Ehrman, S.H. Synthesis of Iron Nanoparticles via Chemical Reduction with Palladium Ion Seeds. *Langmuir*. 2007; 23 (3): 1419–1426.

- [28] Chandra, S.; Kumar, A.; Tomar, P.K. Synthesis and characterization of copper nanoparticles by reducing agent. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014; 18(2): 149-153.
- [29] Bindhu, M. R.; Umadevi, M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. *Materials Letters*. 2014; 120: 122-125.
- [30] Chow, M.K.; Zukoski, C.F. Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1994, 165: 97– 109.
- [31] Mayya K.S.; Patil, V.; Sastry, M. On the stability of carboxylic acid derivatized gold colloidal particles: the role of colloidal solution pH studied by optical absorption spectroscopy. *Langmuir*. 1997; 13: 3944–3947.
- [32] Liu, Y.; Yu Zhang, Y.; Wang, J. Mesocrystals as a class of multifunctional materials. *The Royal Society of Chemistry*. 2014; 16: 5948-5967.
- [33] González, A. L.; Noguez, C.; Beránek, J.; Barnard, A. S. Size, Shape, Stability, and Color of Plasmonic Silver Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014; 118 (17): 9128–9136.
- [34] Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 2009; 27: 76–83.
- [35] Njagi, E.C.; Huang, H.; Stafford, L.; Genuino, H.; Galindo, H.M.; Collins, J.B.; Hoag, G.E.; Suib, S.L. Biosynthesis of Iron and Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Aqueous Sorghum Bran Extracts *Langmuir*. 2011; 27 (1): 264-271.
- [36] Harris, A.T.; Bali, R. On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *Journal of Nanoparticle Research Res*. 2008;9:691–695. doi: 10.1007/s11051-007-9288-5.

- [37] Gardea-Torresdey, J.L.; Parsons, J.; Gomez, E.; Peralta-Videa, J.; Troiani, H.; Santiago, P.; Yacaman, M. Formation and Growth of Au Nanoparticles inside Live Alfalfa Plants. *Nano Letters*. 2002; 2: 397–401
- [38] Manceau, A.; Nagy, K.L.; Marcus, M.A.; Lanson, M.; Geoffroy, N.; Jacquet, T.; Kirpichtchikova, T. Formation of Metallic Copper Nanoparticles at the Soil-Root Interface. *Environmental Science and Technology*. 2008; 42(5): 1766–1772.
- [39] Ghosh, S.; Patil, S.; Ahire, M.; Kitture, R.; Gurav, D.D.; Jabgunde, A.M.; Kale, S.; Pardesi, K.; Shinde, V.; Bellare, J. *Gnidia glauca* flower extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its chemocatalytic potential. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012; 10:17.
- [40] Shiv Shankar, S.; Ahmad, A.; Sastry, M. Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *Biotechnology Progress*. 2003; 19: 1627–1631.
- [41] Shiv Shankar, S.; Rai, A.; Ahmad, A.; Sastry, M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004; 275: 496–502.
- [42] Maensiri S., Laokul P., Klinkaewnarong J., Prokha S., Promark V., Seraphin S., Indium oxide ( $\text{In}_2\text{O}_3$ ) nanoparticles using Aloe vera plant extract: Synthesis and optical properties. *Optoelectronics and Advanced Materials*. 2008; 2: 161–165.
- [43] Vilchis-Nestor, A.R.; Sánchez-Mendieta, V.; Camacho-López, M.A.; Gómez-Espinosa, R.M.; Camacho-López, M.A.; Arenas-Alatorre, J.A. 2008. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camiellia sinensis* extract. *Materials Letters*. 62, 3103–3105.

- [44] Song, J.Y.; Kim, B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009; 32(1): 79–84.
- [45] Haverkamp, R.; Marshall, A. The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009; 11(6): 1453–1464.
- [46] Shiv Shankar, S.; Ahmad, A.; Pasricha, R.; Sastry M. J. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *Journal of Materials Chemistry*. 2003; 13: 1822–1846.
- [47] Singh, A.; Talat, M.; Singh, D.; Srivastava, O.N. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalization with amine group. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010; 12 : 1667-1675.
- [48] Kasthuri, J.; Veerapandian, S.; Rajendiran, N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 68: 55–60.
- [49] Panigrahi, S.; Kundu, S.; Ghosh, S.; Nath, S.; Pal, T. Método geral de síntese para nanopartículas metálicas. *Journal of Nanoparticle Research*. 2004; 6(4): 411–414.
- [50] Glusker, J.; Katz, A.; Bock, C. Metal ions in biological systems. *The Rigaku Journal*. 1999; 16(2): 8–16.
- [51] Si, S.; Mandal, T.K. Tryptophan-Based Peptides to Synthesize Gold and Silver Nanoparticles: A Mechanistic and Kinetic Study *Chemistry*. 2007; 13(11): 3160–3168.
- [52] Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *The Royal Society of Chemistry*. 2015; 17: 6809-6830.

- [53] Kim, J.; Rheem, Y.; Yoo, B.; Chong, Y.; Bozhilov, K.N.; Kim, D.; Sadowsky, M.J.; Hur, H.G.; Myung, N.V. Peptide-mediated shape- and size-tunable synthesis of gold nanostructures. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6(7): 2681–2689.
- [54] Selvakannan, P.; Mandal, S.; Phadtare, S.; Gole, A.; Pasricha, R.; Adyanthaya, S.D.; Sastry, M. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004; 269(1): 97–102.
- [55] Willett, R.L.; Baldwin, K.W.; West, K.W.; Pfeiffer, L.N. Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(22): 7817–7822.
- [56] Ghodake, G.S.; Deshpande, N.G.; Lee, Y.P.; Jin, E.S. Pear fruit extract-assisted room-temperature biosynthesis of gold nanoplates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 75: 584–589.
- [57] Sathishkumar, M.; Sneha, K.; Yun, Y.S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource Technology*. 2010; 101(20): 7958–7965.
- [58] Bankar A., Joshi B., Ravi Kumar A., Zinjarde S. Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;80:45–50.
- [59] Das, R.K.; Gogoi, N.; Bora, U. Green synthesis of gold nanoparticles using *Nyctanthes arbortristis* flower extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011; 34(5): 615–619.
- [60] Lukman, A.I.; Gong, B.; Marjo, C.E.; Roessner, U.; Harris, A.T. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag



- nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010; 353: 433–444.
- [61] Cruz, D.; Fale, P.L.; Mourato, A.; Vaz, P.D.; Luisa Serralheiro, M.; Lino, A.R.L. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 81: 67–73.
- [62] Lin, L.; Wang, W.; Huang, J.; Li, Q.; Sun, D.; Yang, X.; Wang, H.; He, N.; Wang, Y. Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. *Chemical Engineering Journal*. 2010; 162: 852–858.
- [63] Illy, A. A saborosa complexidade do café. A ciência que está por trás de um dos prazeres simples da vida. *Scientific American, Brasil*. 2002; 2.
- [64] Morgano, M.A. et al. Determinação de minerais em café cru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. 2002; 22 (1): 19-23.
- [65] Daglia, M.; Papetti, A.; Gregotti, C.; Bertè, F.; Gazzani, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington*. 2000; 48(5): 1449-1454.
- [66] Borrelli, R. C.; Visconti, A.; Mennella, C.; Anese, M.; Fogliano, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington*. 2002; 50(22): 6527-6533.
- [67] Moreira, R. F. A.; Trugo, L.C.; De Maria, C.A.B. Compostos voláteis do café torrado Parte II Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Química Nova*. 2000; 23(2): 195-203.
- [68] Saldana, M.D.A.; Mazzafera, P.; Mohamed, R.S. Extraction of the alkaloids: caffeine and trigonelline from coffee beans using supercritical. *Food Science and Technology*. 1997; 17(4): 371-376.

- [69] Hernández, L.M.P.; Quiroz, K.C.; Juárez, L.A.M.; Meza, N.G. Phenolic Characterization, Melanoidins, and Antioxidant Activity of Some Commercial Coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Journal of the Mexican Chemical Society. 2012; 56(4): 430-435.
- [70] Adams, A. N.; Borrelli, R. C.; Fogliano, V.; Kimpe, N.D. Thermal degradation studies of food melanoidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(10): 4136-4142.
- [71] Del Castilho, M. D.; Ames, J. M.; Gordon, M. H. Effect of roasting on antioxidante activity of coffee brews. Journal Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50(13): 3698-3703.
- [72] James, J.E. Caffeine and health. San Diego: Academic Press. 1991; 428p.
- [73] Lee, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition on LDL peroxidation. Clinica Chimica Acta. 2000; 295(1-2): 141-154.
- [74] Yanagimoto, K. Ochi, H.; Lee, K.G.; Shibamoto, T.; Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. Journal of agricultural and food chemistry. 2004; 52(3): 592–596.
- [75] Robbins, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003; 51: 2866– 2887.
- [76] Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Review in Food Science and Nutrition. 2005; 45: 287-306.
- [77] Olthof, M.R.; Hollman, P.C.; Katan, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. The Journal of Nutrition. 2001; 131(1): 66-71.

- [78] Natella, F.; Nardini, M.; Giannetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(21): 6211-6216.
- [79] Gonthier, M.P.; Verny, M.A.; Besson, C.; Rémésy, C.; Scalbert, A. Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133: 1853-1859.
- [80] Azuma, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 5496-5500.
- [81] Naczka, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1054: 95-111.
- [82] Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5: 161–171.
- [83] Iwai, K.; Kishimoto, N.; Kakino, Y.; Mochida, K.; Fujita, T. In vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(15): 4893-4898.
- [84] Peng, X.; Manna, L.; Yang, W.; Wickham, J.; Scher, E.; Kadavanich, A.; Alivisatos, A.P. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature*. 2000; 404: 59–61.
- [85] Ithurria, S.; Tessier, M.D.; Mahler, B.; Lobo, R.P.S.M.; Dubertret, B.; Efros, A. L. Colloidal nanoplatelets with two-dimensional electronic structure. *Nature Materials*. 2011; 10: 936–941.
- [86] Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; Dubois, L. H. Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications

- for molecular self-assembly on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1987; 109(3): 733–740.
- [87] Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1992; 43: 437–463.
- [88] Hakkinen, H. The gold–sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry*. 2012; 4: 443–455.
- [89] Morris-Cohen, A. J.; Malicki, M.; Peterson, M. D.; Slavin, J. W. J.; Weiss, E. A. Chemical, structural, and quantitative analysis of the ligand shells of colloidal quantum dots. *Chem. Mater.* 25, 1155–1165 (2013).
- [90] Protesescu, L.; Nachttegaal, M.; Voznyy, O.; Borovinskaya, O.; Rossini, A.J.; Emsley, L.; Copéret, C.; Günther, D.; Sargent, E.H.; Kovalenko, M.V. Atomistic description of thiostannate-capped CdSe nanocrystals: retention of four-coordinate SnS<sub>4</sub> motif and preservation of Cd-rich stoichiometry. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137(5): 1862–1874.
- [91] Badia, A.; Cuccia, L.; Demers, L.; Morin, F.; Lennox, R. B. Structure and dynamics in alkanethiolate monolayers self-assembled on gold nanoparticles: a DSC, FT-IR, and deuterium NMR study. *Journal of the American Chemical Society*. 1997; 119(11): 2682–2692.
- [92] Llodes, A.; Garcia, G.; Gazquez, J.; Milliron, D.J. Tunable near-infrared and visible-light transmittance in nanocrystal-in-glass composites. *Nature*. 2013; 500: 323–326.
- [93] Murray, C.B.; Kagan, C.R.; Bawendi, M.G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annual Review of Materials Science*. 2000; 30: 545–610.

- [94] Kovalenko, M. V.; Scheele, M.; Talapin, D. V. Colloidal nanocrystals with molecular metal chalcogenide surface ligands. *Science*. 2009; 324: 1417–1420.
- [95] Mattoussi, H.; Cumming, A. W.; Murray, C. B.; Bawendi, M.G.; Ober, R. Properties of CdSe nanocrystal dispersions in the dilute regime: structure and interparticle interactions. *Materials Research in the Physical Review Journals*. 1998; 58: 7850–7863.
- [96] Huang, J.; Li, Q.; Sun, D.; Lu, Y.; Su, Y.; Yang, X.; Wang, H.; Wang, Y.; Shao, W.; He, N. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*. 2007; 18(10): 1-11.
- [97] ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*. 2000; 11: 419- 421.
- [98] Blanco, L.L.J.; Zapata, V.F.M.; García D.J. Statistical analysis of laboratory results of Zn wastes leaching. *Hydrometallurgy*. 1999; 54(1): 41–48.
- [99] Hanrahan, G.; Lu, K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2006; 36(3-4): 141–151.
- [100] Karabegović, I.T.; Stojičević, S.S.; Veličković, D.T.; Nikolić, N.C.; Lazić, M.L. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry Laurel Fruit. *Journal Separation Science and Technology*. 2014; 49 (3): 416-423.
- [101] Yaminia, Y.; Khajeh, M.; Ghasemi, E.; Mirza, M.; Javidnia, K.d. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 2008; 108(1): 341-346.

- [102] Tiwari, P.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G.; Kaur, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011; 1(1): 98-106.
- [103] Rattmann, Y.D.; Stelia, C.; Sánchez, M.; Furian, A.F.; Paludo, K.S.; Souza, L.M.; Dartora, N.; Oliveira, M.S.; Costa, E.M.S.; Miguel, O.G.; Sasaki, G.L.; Lacomini, M.; Mello, C.F.; Franco, C.R.C.; Santos, J.E.S.; Cadena, S.M.S.C.; Marques, M.C.A.; Santos, A.R.S. RATTMANN, Y.D. et al. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.133, p.999-1007, 2011.
- [104] Merritt, M.C.; Proctor, B.E. 1959. Extraction Rates for Selected Components in Coffee Brew. *Journal of Food Science*. 1959; 24 (6): 735–743.
- [105] Peleg, M.; Normand, M.D.; Corradini, M.G. The Arrhenius Equation Revisited. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012; 52: 830-851.
- [106] Andueza, S.; Maeztu, L.; Pascual, L.; Ibáñez, C.; Peña, M.P.; Cid, C. Influence of extraction temperature on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2003; 83 (3): 240–248.
- [107] Briandet, R.; Kemsley, K.; Wilson, R. H. Discrimination of Arabica and Robusta in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; 44: 170–174.
- [108] Craig, A. P.; Franca, A. S.; Oliveira, L. S. Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 132: 1368–1374.

- [109] Deshpande, S.; El-Abassy, R. M.; Jaiswal, R.; Eravuchira, P.; Kammer, B.; Materny, A.; Kuhnert, N. Which spectroscopic technique allows the best differentiation of coffee varieties: comparing principal component analysis using data derived from CD, NMR- and IR-spectroscopies and LC-MS in tanalysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans. *JournalAnalytical Methods*. 2014; 6 (10): 3268-3276.
- [110] Robert M.S. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, 2014.
- [111] Kemsley, E.K.; Holland, J. K.; Defernez, M.; Wilson, R.H. Detection of Adulteration of Raspberry Purees Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; 44 (12): 3864–3870.
- [112] Briandet, R.E.; Kemsley, E.K.; Wilson, R.H. Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; 44 (1): 170-174.
- [113] Farah, Adriana. 2 Coffee Constituents. 59 (2012).
- [114] Hwang , S.J.; Juin, S.J.; Park, Y.; Cha S.H.; Yoon, M.; Cho, S.; Lee, H.J.; Park, Y. Green synthesis of gold nanoparticles using chlorogenic acid and the enhanced performance for inflammation. *Nanomedicine*. 2015; 11 (7): 1677–1688.
- [115] Baranska, M.; Schulz, H. Chapter 4 Determination of Alkaloids through Infrared and Raman Spectroscopy. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. 2009; 67: 217-255.
- [116] Dubey, S.P.; Lahtinen, M.; Sillanpaa, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry*. 2010; 45: 1065–1071.

- [117] Malvern Instruments. Zetasizer Nano Series User Manual. Man0317. 2004; Issue 1.1.
- [118] Lin, S.Y.; Tsai, Y.T.; Chen, C.C.; Lin, C.M.; Chen, C.H. Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004; 108 (7): 2134-2139.
- [119] Tsai, D.H.; Hawa, T.; Kan, H.C.; Phaneuf, R.J.; Zachariah, M.R. Spatial and size-resolved electrostatic-directed deposition of nanoparticles on a field-generating substrate: theoretical and experimental analysis. *Nanotechnology*. 2007; 18(36).
- [120] Mulvaney, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*. 1996; 12(3): 788-80.



## 8. APÊNDICE

### ARTIGO

#### **Biossíntese controlada de nanopartículas de ouro com *Coffea arabica* utilizando planejamento fatorial**

Wanderson Juvencio Keijok<sup>1\*</sup>, Rayssa Helena Arruda Pereira<sup>1\*</sup>, Luis Alberto Contreras<sup>1</sup>, André Romero da Silva<sup>2</sup>, Jairo Pinto de Oliveira<sup>1</sup> and Marco C.C. Guimarães<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Health Science Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>2</sup> Federal Institute of Espírito Santo, Aracruz, ES, Brazil

\* The authors contributed equally to this work

#### **Resumo**

A síntese verde de nanopartículas metálicas vem se tornando incrivelmente popular, principalmente por minimizar problemas de contaminação ambiental e ser capaz de reduzir, estabilizar e potencialmente funcionalizar o nanomaterial. Entretanto, a falta de reprodutibilidade e a escassez de informações sobre os mecanismos de controle durante a síntese tem inviabilizado sua aplicação. Desta forma, este trabalho propôs a investigação dos principais mecanismos que afetam o controle da síntese, utilizando planejamento fatorial para a preparação de nanopartículas de ouro na presença do extrato de *Coffea arabica*. As nanopartículas obtidas se apresentaram estáveis (Potencial Zeta, UV-vis e DLS), monodispersas e quase-esféricas (MET), com estrutura cristalina definida (DRX) e com a presença de moléculas aromáticas adsorvidas (FTIR e RAMAN), comprovando que o extrato vegetal atuou como agente redutor, estabilizador e funcionalizador das nanoestruturas sintetizadas. O planejamento fatorial utilizado para obtenção das nanopartículas de ouro com extrato de *Coffea arabica* possibilitou a síntese controlada e reprodutível, abrindo novas perspectivas para aplicações em diversos campos a serem explorados.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de ouro; *Coffea arabica*; Síntese verde; Planejamento fatorial.

## Introdução

Nanopartículas metálicas têm sido extensivamente aplicadas em diversas tecnologias, devido principalmente às suas interessantes propriedades ópticas, eletromagnéticas e a alta relação área/volume. No entanto, para a efetiva aplicação desses materiais em dispositivos nanotecnológicos, é crucial o desenvolvimento de sistemas altamente controlados, que regulem o controle de tamanho, dispersão e rendimento.

Diferentes processos físicos e químicos são atualmente utilizados para sintetizar nanopartículas metálicas, que permitem obter partículas com as características desejadas [4-6]. No entanto, esses métodos de produção são geralmente caros, dispendiosos e potencialmente perigosos para o meio ambiente e organismos vivos [5,6].

Portanto, existe um interesse generalizado no desenvolvimento de processos não tóxicos, confiáveis, biologicamente compatíveis e favoráveis ao ambiente para sintetizar nanopartículas [9-12]. Durante a última década, demonstrou-se que muitos sistemas biológicos, incluindo plantas e algas [13], bactérias [14], fungos [15] e células humanas [16] podem transformar íons metálicos inorgânicos em nanopartículas metálicas, através da capacidade redutora das moléculas e substâncias presentes nesses organismos.

A produção de nanopartículas usando plantas exhibe vantagens, como o baixo custo de cultivo, o tempo de produção curto, a segurança e a capacidade de aumentar os volumes de produção tornam as plantas uma plataforma atraente para a síntese de nanopartículas metálicas [10]. As plantas produzem biomoléculas funcionais que podem reduzir ativamente íons metálicos, estabilizando-os e, conseqüentemente funcionalizando-os. Neste trabalho, utilizamos o extrato de *Coffea arabica* como modelo, devido a grande diversidade de compostos fenólicos.

Apesar da aplicabilidade diversa desses nanomateriais, a padronização da síntese verde de nanopartículas permanece um desafio. Principalmente a influência dos parâmetros de síntese no crescimento e tamanho das partículas. Além disso, a grande diversidade de compostos envolvidos nos processos de redução e estabilização inviabiliza processos reprodutíveis de síntese. Nesse sentido, este trabalho propõe um estudo detalhado das principais variáveis que interferem no rendimento e controle da síntese e propõe um

modelo de otimização utilizando planejamento fatorial, que servirá como plataforma modelo para síntese controlada de nanopartículas de tamanho controlado.

## **Material e métodos**

### *Material vegetal*

As sementes verdes de Café arábica foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura para remoção de impurezas e depois secas em temperatura ambiente 25 ° C por 16 horas. O extrato aquoso que obteve melhor resultado frente a capacidade antioxidante foi escolhido. As sementes secas foram trituradas em um pequeno moinho elétrico (Di Grano Cadence, MDR302) e transferidas para uma garrafa de vidro âmbar e colocadas na geladeira antes do processo de extração. O café possui certificação internacional de orgânico.

### *Síntese de nanopartículas de ouro*

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de oxirredução utilizando a solução de  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma - Aldrich). As demais condições experimentais foram determinadas pelo planejamento experimental. Após cada etapa de síntese o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em água ultrapura.

### *Planejamento experimental*

Visando otimizar a síntese de nanopartículas de ouro foi realizado um planejamento experimental. Como o número de variáveis que afetam a síntese são muitas, optou-se por selecionar os principais níveis para otimização a partir de um planejamento fatorial fracionado. Assim, utilizamos o planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  para seleção das variáveis significativas, analisando a largura de banda a meia altura como variável resposta. Após a definição das variáveis mais significativas, 2 delas foram escolhidas para a otimização (Tabela 1). Assim, um planejamento experimental fatorial completo ( $3^2$ ) com 3 níveis e 2 fatores foram realizados para otimização da síntese.

**Tabela 1.** Condições do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de café.

Fatores	Intervalo de Estudo		
	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
pH	1,4	5,4	7,4
Temperatura (°C)	30	50	70

#### *Caracterização das nanopartículas de ouro*

Os coloides tiveram suas propriedades ópticas analisados pelo espectrofotômetro de absorção no UV-vis (Evolution® 300 ThermoScientific). O diâmetro médio e da Razão de aspecto, de 1000 partículas foram analisadas no software Image J, apartir das imagens de microscopia (TEM-JEM-1400, JEOL, USA inc. operado a 120kv). A difração de raios-X foi analisado utilizando o difratômetro da Phillips PW 1710 (Cuk $\alpha$  radiação). A estabilidade (Potencial Zeta) e o tamanho hidrodinamico (DLS) do nanomaterial foi avaliada pelo instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrak. As medidas de Espectroscopia de Infravermelho e o Espalhamento Raman foram realizadas respectivamente no modo FTIR (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) e no Raman (ALPHA 300R Confocal Raman Spectrometer). A concentração total de nanopartículas foi determinada usando plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas (ICP-MS) da Perkin Elmer modelo Optima 7000, USA.

## Resultados e discussão

### Planejamento fatorial completo

As variáveis (pH, tempo, temperatura, concentração do extrato e agitação) foram estudadas utilizando planejamento fatorial fracionado ( $5^{-1}$ ) a fim de determinar quais destes parâmetros eram mais significativos ( $p \leq 0,05$ ) no rendimento da síntese das AuNPs utilizando a absorbância máxima (Abs máx) como variável resposta. Os resultados podem ser observados em detalhes no material suplementar, sendo o pH e a temperatura as variáveis que mais interferiram. Deste modo, estas variáveis foram escolhidas para a otimização da síntese de nanopartículas de tamanho controlado utilizando planejamento fatorial completo ( $3^2$ ). As respostas FWHM (largura de banda a meia altura), Abs máx e  $\lambda$  máx, foram utilizadas para avaliar a influência da síntese na monodispersão, rendimento da reação, e tamanho das nanoestruturas respectivamente, conforme pode ser observado na tabela 2.

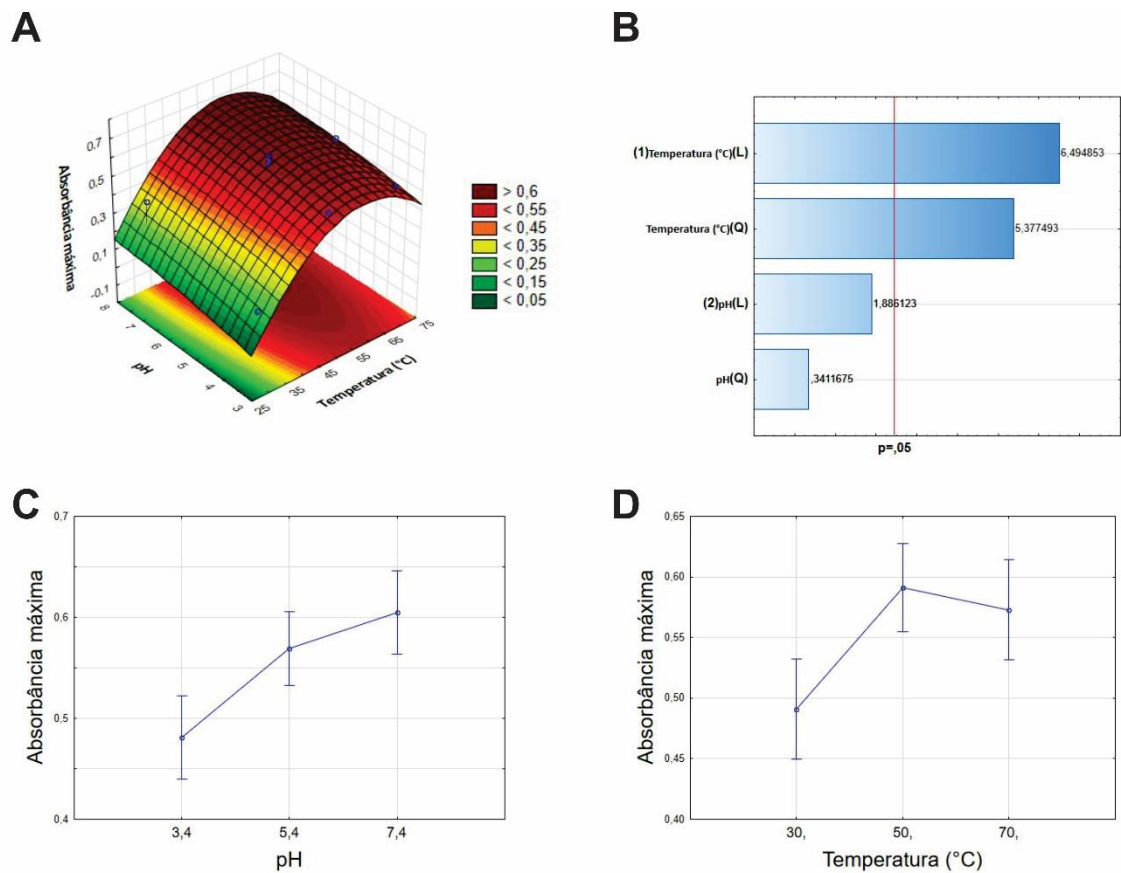
**Tabela 2.** Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de café, apresentando as variáveis respostas (Abs máx, FWHM e  $\lambda$  máx).

n° de ensaio	Condições de Reação – Síntese com Extrato de <i>Coffea arabica</i>				
	Variáveis estudadas		Resposta		
	pH	Temperatura (°C)	Abs. Máximo	FWHM	$\lambda$ máximo
1	1,4	30	0,20245	2,47762	556
2	5,4	30	0,18745	1,54913	567
3	7,4	30	0,38238	71,2066	557
4	1,4	50	0,54951	41,50621	545
5	5,4	50	0,62677	61,7487	533
6	7,4	50	0,6062	80,78877	544
7	1,4	70	0,53067	57,77085	557
8	5,4	70	0,60161	64,82886	536
9	7,4	70	0,56172	71,6236	545
10	5,4	50	0,65953	61,98177	533
11	5,4	50	0,6085	61,89776	533

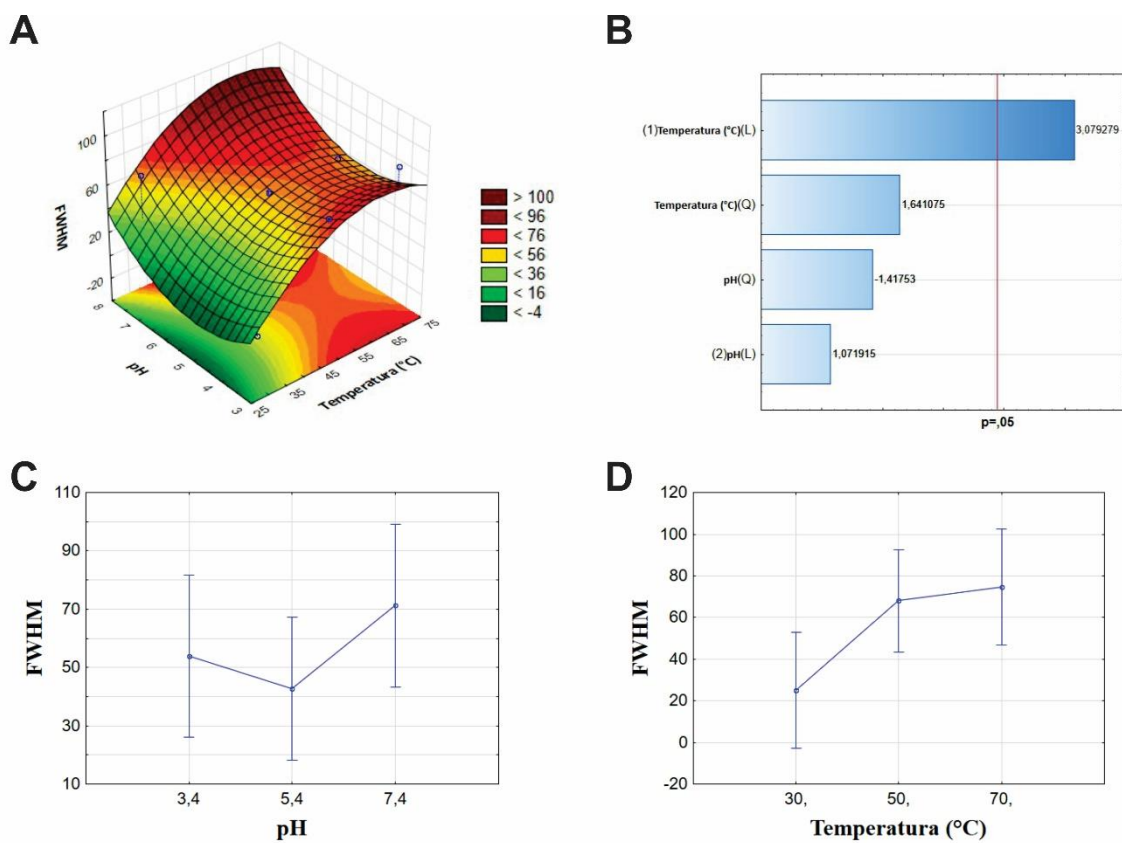
A figura 1,2,3 apresenta o gráfico de superfície resposta do planejamento fatorial completo, diagrama de Pareto e a influência de cada uma das variáveis analisadas.

O gráfico de superfície resposta do planejamento fatorial completo, diagrama de Pareto e a influência de cada uma das variáveis analisadas mostra a interação entre as duas variáveis analisadas (temperatura e pH) para obter a resposta ótima (Figura 1,2,3). O valor ótimo da resposta pode ser um valor máximo ou um valor mínimo, dependendo do produto ou processo em questão. As metodologias que ajudam o experimentador a alcançar a meta de resposta ideal são referidas como métodos de superfície de resposta.

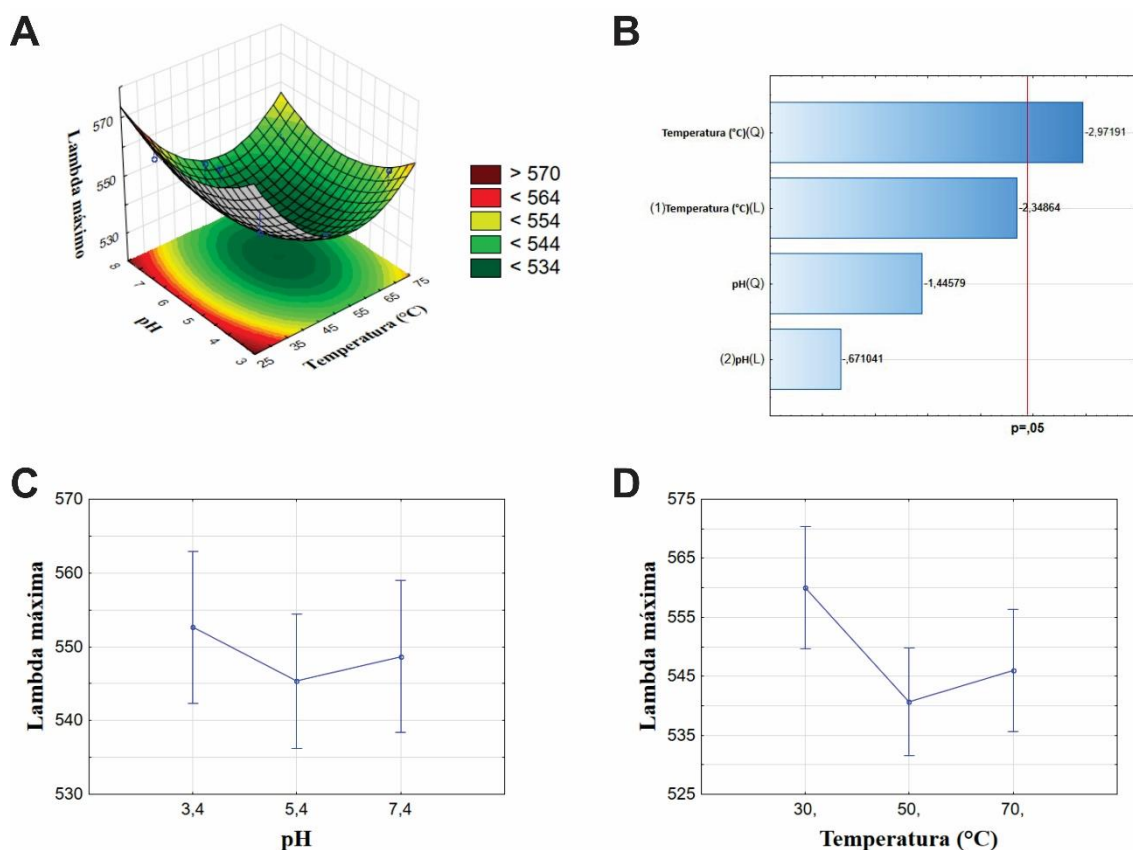
Esses métodos são usados exclusivamente para examinar a "superfície", ou a relação entre a resposta e os fatores que afetam a resposta.



**Figura 1.** Gráfico de superfície resposta das nanopartículas sintetizadas com café e absorbância (530nm) em função das variáveis (A); Digrama de Pareto indicando as variáveis que foram significativas no processo (B); Influência do pH em relação a variável resposta absorbância máxima (C); Influência da temperatura do extrato em relação a variável resposta absorbância máxima (D).



**Figura 2.** Gráfico de superfície resposta das nanopartículas sintetizadas com café, e FWHM em função das variáveis (A); Digrama de Pareto indicando as variáveis que foram significativas no processo (B); Influência do pH em relação a variável resposta FWHM (C); Influência da temperatura do extrato em relação a variável resposta FWHM (D).



**Figura 3.** Gráfico de superfície resposta das nanopartículas sintetizadas com café e Lambda máximo em função das variáveis (A); Digrama de Pareto indicando as variáveis que foram significativas no processo (B); Influência do pH em relação a variável resposta Lambda máximo (C); Influência da temperatura do extrato em relação a variável resposta Lambda máximo (D).

No gráfico de Pareto, a temperatura representa o fator com a maior influência estatisticamente significativa (Figura 3B). Essa resposta pode ser representada devido a temperatura cruzar a linha de referência que está em 0,05.

Muitas vezes, o objetivo da pesquisa é identificar condições em que a resposta é ótima, não para caracterizar toda a superfície de resposta. Para tal objetivo, uma estratégia experimental precisa apenas determinar as combinações de fatores que otimizam a resposta. É possível encontrar o rendimento máximo (absorbância máxima), nanomaterial com a maior monodispersão (FWHM) e controle de tamanho ou forma (Lambda máximo), devido os resultados obtidos pelo gráfico de superfície resposta demonstrarem representativamente (Figura 1,2,3) e numericamente a melhor resposta (Tabela 3).

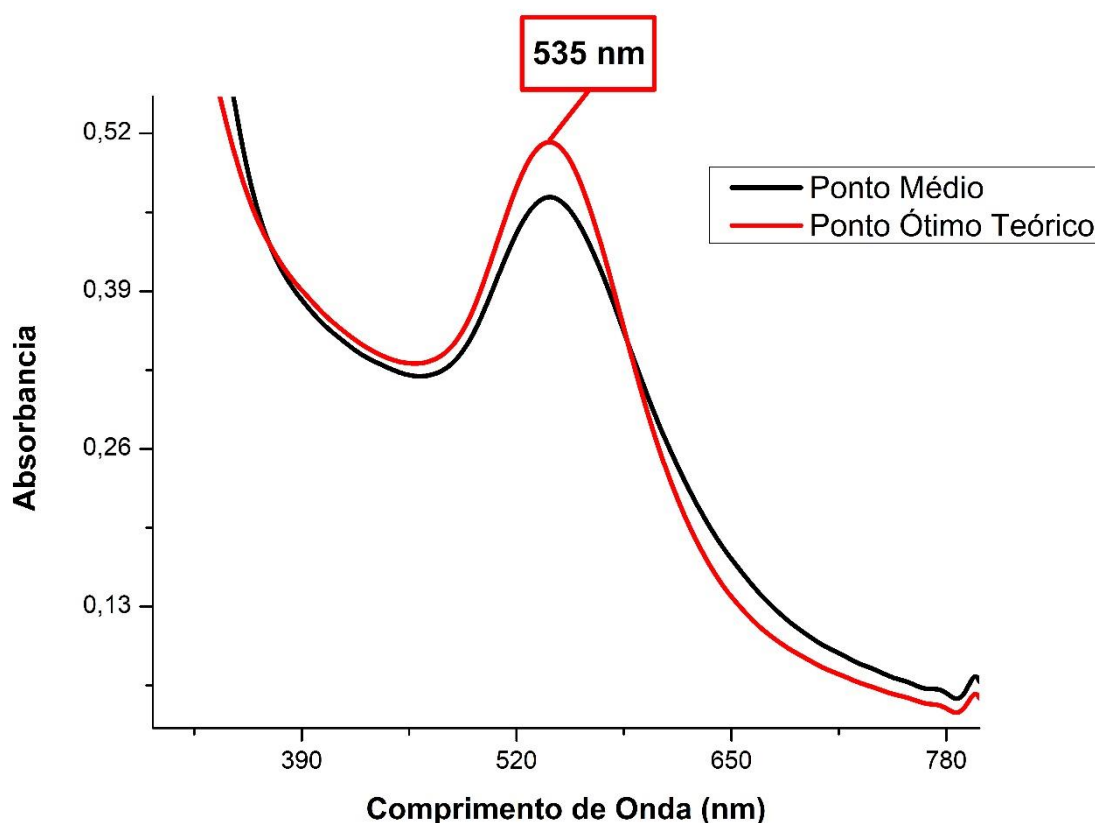


**Tabela 3.** Combinação de pH e temperatura para obtenção do ponto ótimo teórico.

<b>Absorbância máxima</b>			
<b>Variáveis</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Condição Ótima</b>	<b>Máximo</b>
<b>pH</b>	3,40000	8,15838	7,40000
<b>Temperatura (°C)</b>	30,00000	60,34737	70,00000
<b>FWHM</b>			
<b>Variáveis</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Condição Ótima</b>	<b>Máximo</b>
<b>pH</b>	3,40000	4,90864	7,40000
<b>Temperatura (°C)</b>	30,00000	62,19245	70,00000
<b>Lambda máximo</b>			
<b>Variáveis</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Condição Ótima</b>	<b>Máximo</b>
<b>pH</b>	3,40000	5,70159	7,40000
<b>Temperatura (°C)</b>	30,00000	55,13514	70,00000

A absorbância máxima foi escolhida como a variável resposta para a caracterização do nanomaterial, visto que para nanopartículas metálicas, este parâmetro está relacionado com o rendimento na formação das nanopartículas no sistema coloidal.

Para validar o modelo estatístico utilizado, uma nova síntese de NP'sAu foi realizada com as condições otimizadas previstas para absorbância máxima, essa variável foi escolhida para a caracterização do nanomaterial, conforme mostradas no gráfico de UV-Vis, conforme Figura 4. Foi verificado que o ponto ótimo predito possui maiores valores de absorbância máxima e menor largura de banda do que o ponto médio (melhor condição avaliada), confirmando o ajuste do modelo. Pode-se afirmar também que o planejamento estatístico fatorial é uma ferramenta útil para a otimização das variáveis que afetam a síntese verde.



**Figura 4.** Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro do ponto médio do planejamento fatorial completo e do ponto ótimo.

O objetivo é encontrar a combinação e as condições associados à resposta ótima sem avaliar todas as possíveis combinações de fatores da superfície resposta. Um projeto fatorial completo permitiu encontrar a combinação de pH e temperatura ótimo para obter a melhor resposta (Tabela 3) durante o tratamento experimental.

**Tabela 4.** Comparação entre as variáveis resposta do ponto médio e do ponto ótimo teórico.

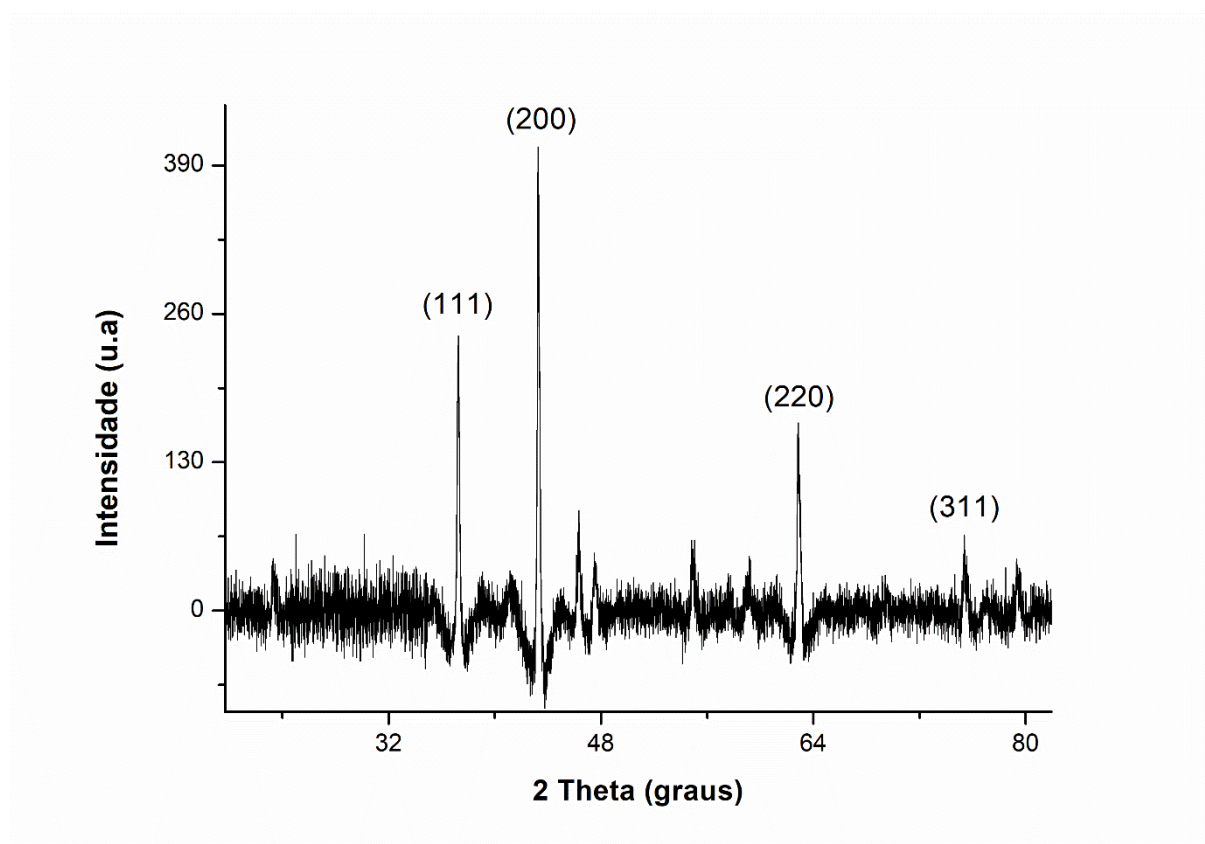
Ensaio	Respostas			
	FWHM	$\lambda$ máximo	Abs. Máx	Area abaixo da curva
Ponto Médio	71,52629	540	0,71749	14,62047
Ponto Ótimo Teórico	66,4522	540	0,76282	12,83409

Vários pontos da resposta foram avaliados durante a comparação entre o ponto médio do planejamento fatorial completo e ponto ótimo estatisticamente. O resultado demonstrou que o ponto ótimo causa melhora na FWHM, absorbância máxima e área abaixo da curva e não causa alteração no  $\lambda$  máximo (Tabela 4), influenciando positivamente os resultados.

### *Caracterização das AuNPs*

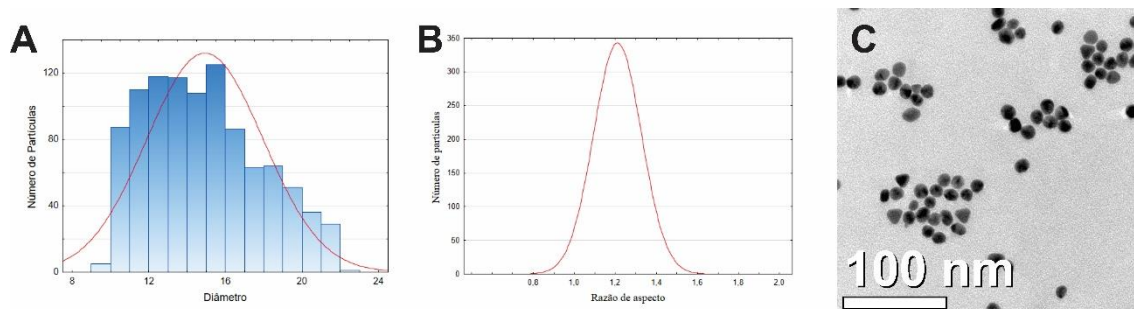
As Nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de café obtiveram diâmetro médio de aproximadamente 13,87nm, conforme contagem de 1000 nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 6A).

A forma esférica predomina ao observar a imagem de MET dos nanomateriais (Figura 6C), também pode ser verificada a esfericidade das nanopartículas com os dados da razão de aspecto (RA) obtidas pela medição de 1000 nanopartículas obtidas por imagens de MET (Figura 6B) quase-esféricos (RA ~1,17nm).



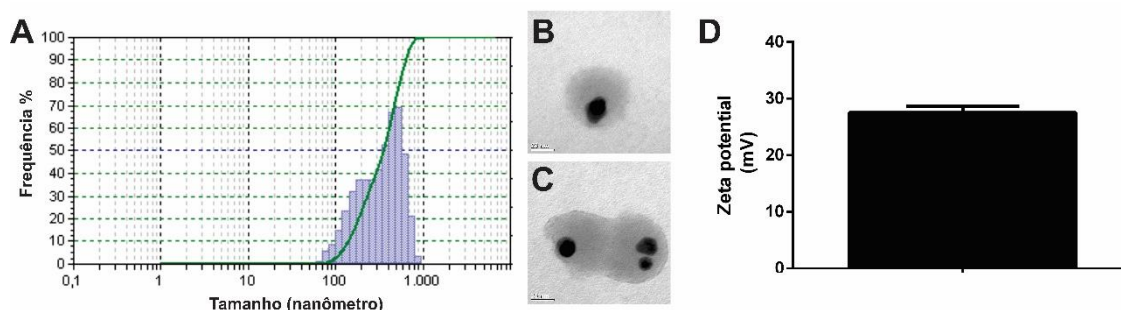
**Figura 5.** Difratoograma de raios-X das NP'sAu.

A natureza cristalina das AuNPs foi confirmada por análise de DRX (Figura 5). Os quatro picos de difração intensos foram observados a  $2\theta$ , sendo os valores encontrados de 38,31 °, 44,45 °, 64,64 ° e 77,73 °, correspondente ao (111), (200), (220), e (311) de reflexão do ouro metálico cristalino, respectivamente (Figura 5). Um forte pico de difração (200) sugere que este padrão é a orientação predominante de AuNP's. A concentração foi determinada por ICPMS e o resultado foi de 34,4695 mg/L de Au.



**Figura 6.** Histograma mostrando a distribuição gaussiana de diâmetro (A) e a razão de aspecto (RA) de 1000 partículas obtidas por imagens feitas de microscopia eletrônica de transmissão (B); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (C).

O diâmetro das nanopartículas de ouro utilizando o MET (Figura 6A) e a DLS (Figura 7A) mostra nanopartículas com uma escala de diâmetro diferente. Esse resultado ocorre devido a dispersão de luz dinâmica ser empregada para medir o diâmetro hidrodinâmico das suspensões das nanopartículas. Os valores diferentes dos mesmos nanomateriais é explicado pela nuvem formada por moléculas provenientes do extrato vegetal, a ligação dessas moléculas a superfície do nanomaterial gera um diâmetro hidrodinâmico maior. É possível visualizar o extrato no entorno das partículas, como resultado da contrastação negativa prévia com acetato de uranila Figura 7(BC). Esse procedimento foi realizado com o intuito de comprovar visualmente a adsorção do extrato. A diferença entre o diâmetro médio obtido por microscopia eletrônica de transmissão (aproximadamente 14 nm) e por DLS (aproximadamente 500 nm) leva à confirmação da adsorção, visto as diferenças devido ao raio hidrodinâmico, como pode ser visto na Figura 7(B; C).



**Figura 7.** Gráfico de DLS das nanopartículas em função da frequência de tamanho (A). Imagem obtidas após a contrastação do material com acetato de uranila, sendo possível observar a presença do extrato no entorno das partículas, confirmando a resposta do DLS (B, C). Potencial zeta da dispersão da condição ótima de síntese (D).

As AuNP's sintetizadas com o extrato de café na condição ótima, apresentou um potencial zeta de aproximadamente +28 mV (Figura 7D). Este potencial demonstra que as nanopartículas possuem instabilidade incipiente [117]. Uma explicação para o valor positivo do potencial zeta das partículas protonadas é a adsorção de biomoléculas protonadas.

#### ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS

As atribuições das absorções (Tabela 5) do espectro de FTIR do extrato do café podem estar associadas aos ácidos clorogênicos, compostos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, dentre outros componentes específicos de amostras de café.

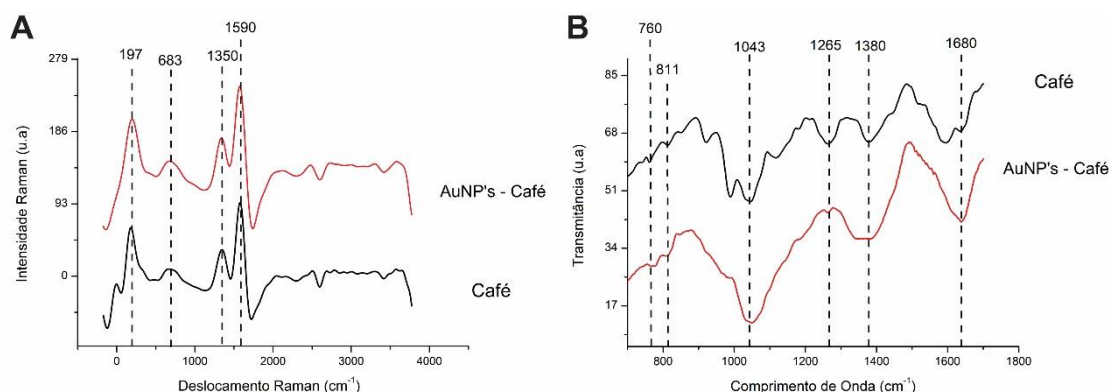
**Tabela. 05.** Espectros de FTIR das amostras de café Arábica

<b>Bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
1680	Estiramento da ligação C=O de compostos aromáticos aldeído ou cetona
1380	Estiramento da ligação C=C
1265	Dobramento C-H no plano
1043	Deformação C-O
811	Curvatura C-H fora do plano
760	Alongamento C-X (X = F, Cl, Br ou I)

Nesta abordagem, a presença da banda forte entre 1550 e 1750 cm<sup>-1</sup> em espectros pode ser atribuída à molécula de cafeína, enquanto que uma forte banda de absorção entre 1150 e 1300 cm<sup>-1</sup> é atribuível ao ácido clorogênico [110, 111]. Este novo perfil é possivelmente devido ao processo de redução de oxidação para a formação de Au<sup>0</sup>, que pode ocorrer entre moléculas polifenólicas que reduzem Au<sup>3+</sup> por álcoois fenólicos [113] ou grupos carboxílicos; ou pela instabilidade térmica de alguns dos componentes do extrato, como ácidos clorogênicos e lactonas [112].

Os espectros produzidos pelo espalhamento Raman de AuNPs e do extrato de café liofilizado apresentaram modos intensos de alongamento com deslocamento Raman próximo de 1350 e 1590 cm<sup>-1</sup>, que correspondem a estiramentos de carboxilatos simétricos e assimétricos, respectivamente (Figura 8). A banda em 683 cm<sup>-1</sup>, pode pertencer a cafeína, devido outro estudo demonstrar um duplo duplete médio para a cafeína visto em 643 e 741 cm<sup>-1</sup> [115].

A espectroscopia na região do infravermelho e o espalhamento Raman vem confirmar que os componentes do extrato estão criando uma espécie de camada de revestimento.



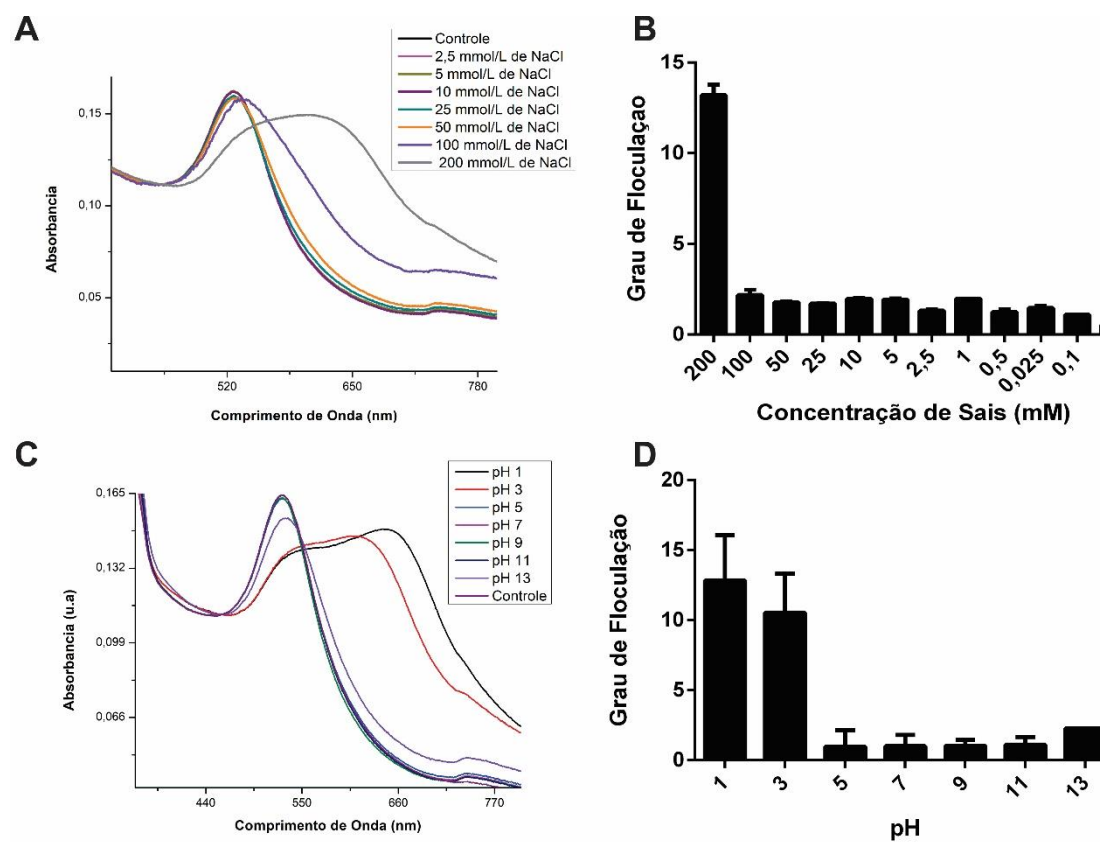
**Figura 8 .** Espectro de infravermelho do extrato de café e do coloide de NP'sAu

### *Estabilidade das AuNPs*

A estabilidade das AuNPs sintetizadas foi estudada utilizando o parâmetro de floculação. Este parâmetro é uma medida semi-quantitativa da agregação que utiliza a integral do espectro de absorção entre 600 e 800 nm. As mudanças de absorção do coloide em diferentes faixas de pH e força iônica (NaCl) foram realizadas, haja visto que para aplicações biológicas a estabilidade dos nanomateriais pode ser influenciada devido a alterações constantes dessas condições no meio.

Para a estabilidade em relação a força iônica, o parâmetro de floculação foi avaliado utilizando concentrações crescentes de NaCl (200mM a 0.05mM) conforme pode ser observado na figura 9(A,B). Nesse caso, pode ser observado que a partir da concentração 100mM o espectro de absorção apresenta um ligeiro desvio para a direita (redshift) e um aumento expressivo da absorção na região de 600 a 800 nm, indicando uma possível perda de estabilidade e consequentemente agregação das AuNPs. Para a avaliação da estabilidade frente a diferentes faixas de pH, o coloide foi colocado em diferentes concentrações de H<sup>+</sup> no meio (pH de 01 a 13) de acordo figura 9(C,D). Pode ser observado que o pH tem influencia direta na estabilidade dos nanomateriais, sendo que o meio ácido (pH < 5) promoveu agregação do coloide. No entanto, os nanomateriais apresentaram boa estabilidade numa ampla faixa de pH em meio ligeiramente ácido e meio básico (pH 5 a 11). Estes resultados mostraram que as AuNP's

sintetizadas com extrato de *coffea arabica* apresentaram boa estabilidade para uma ampla gama de aplicações em sistemas biológicos.



**Figura 9.** Espectro de absorção mostrando o coloide de NP'sAu com extrato de café na formulação otimizada, em diferentes concentrações de NaCl (A). Gráfico demonstrando o grau de floculação, a partir do aumento da area entre 600 e 800 nm (B).

## Conclusões

Este estudo foi realizado a fim de tornar a síntese de nanopartículas de ouro um processo controlado e reprodutível. Para isso, várias condições de obtenção do extrato foram realizadas em função da atividade antioxidante. Além disso, um planejamento fatorial fracionado (5-1) foi realizado para o estudo das variáveis que interferem no rendimento da síntese verde de nanopartículas de ouro utilizando extrato de *coffea arabica*.

Por fim, o processo foi otimizado por meio do planejamento fatorial completo (32) com discussões a respeito das variáveis de saída, a saber: monodispersão (FWHM), rendimento da síntese (Abs máx) e tamanho final das NPs ( $\lambda$  máx). O ajuste do modelo foi realizado e os valores preditos se confirmaram após um ensaio teste.

Por fim, os nanomateriais sintetizados apresentaram-se monodispersos, quase-esféricos (RA  $\sim 1,17$ ) e com boa estabilidade (+28 mV). Além disso, foi possível comprovar a adsorção do extrato de *Coffea arabica* na superfície das AuNPs, utilizando diferentes técnicas como MET, DLS, FTIR e Raman. Visando aplicações em sistemas biológicos, o parâmetro de floculação foi avaliado e as NPs mostraram-se estáveis em uma ampla faixa de pH (5 a 11) e força iônica (0,05 a 100 mmols.L<sup>-1</sup> NaCl).



## Referências

- 1 A. Z. Wilczewska, K Niemirowicz, K H Markiewicz, H Car Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 2012, 64, 1020.
- 2 D. Yeo, C. Wiraja, Y. J. Chuah, Y Gao, C Xu A Nanoparticle-based Sensor Platform for Cell Tracking and Status/Function Assessment *Scientific Reports* 2015, 5, 1-14.
- 3 F. Mafune, J. Kohno, Y. Takeda, T. J. Kondow, J. *Phys. Chem. B* 2001, 105, 9050–9056.
- 4 G. Zhang, D. J. Wang, J. *Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5616–5617.
- 5 M. Treguer, C. Cointet, H. Remita, J. Khatouri, M. Mostafavi, J. Amblard, J J Belloni, J. *Phys. Chem. B* 1998, 102, 4310–4321.
- 6 W. Chen, W. Cai, L. Zhang, G. Wang, L. Zhang, J. *Colloid Interface Sci.* 2001, 238, 291–295.
- 7 L. Rodríguez-Sánchez, M.C. Blanco, M.A. Lopez-Quintela, J. *Phys. Chem. B* 2002, 104, 9683–9688.
- 8 S. Eustis, H.Y. Hsu, M.A. El-Sayed, J. *Phys. Chem. B* 2005, 109, 4811–4815.
- 9 A. Frattini, N. Pellegrini, D. Nicastro, O. de Sanctis, *Mater. Chem. Phys.* 2005, 94, 148–152.
- 10 M. Starowiicz, B. Stypula, J. Banas, Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 227–230.
- 11 P.R. SELVAKANNAN, S. MANDAL, S. PHADTARE, R. PASRICHA, M. SASTRY. *Langmuir*, 2003, 19, pp 3545–3549.
- 12 P.D. Jadzinsky, G. Calero, C.J. Ackerson, D.A. Bushnell, RD Kornberg, *Science*, 2007, 318, 430-3.
- 13 M. R. Langille, M. L. Personick, J. Zhang and C. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134 , pp 14542–14554.
- 14 P. Alexandridis, *Chem. Eng. Technol.* 2011, 14, 15–38.
- 15 S. Iravani, *Green Chemistry*, 2011, 13, pp. 2638–2650.
- 16 O.V. Kharissova, H.V.R. Dias, B.I. Kharissova, B.O. Pérez, V. M.J. Pérez, T. *trends in Biotechnology*, 2013, 31, pp. 240-248.
- 17 J. G. Leu, S.A. Chen, H. M. Chen et al., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012, 8, pp. 767–775.
- 18 Y. Park, Y.N. Hong, A. Weyers, Y.S. Kim AND R. J. Linhardt, *IET Nanobiotechnology*, 2011, 5, pp. 69–78.

- 19 F. He, J. Liu, C.B. Roberts, and D. Zhao, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2009, 48, pp. 6550–6557.
- 20 P. Raveendran, J. Fu and Wallen, S.L., *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, pp. 13940–13941.
- 21 R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney and R.W. Murray, *Langmuir*, 2009, 25, pp. 13840–13851.
- 22 N. Roy, S. Mondal, R. A . Laskar, S. Basu, D. Mandal, N. A. Begum, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 2010, 76, 317-325.
- 23 K.N. Thakkar, S.S. Mhatre, R.Y. Parikh, *Nanotechnol. Biol. Med. Nanomed.* 2010, 6, 257–262.
- 24 W.H. De Jong, W.I. Hagens, P Krystek, M C Burger, A J Sips AJ, RE Geertsma. *Biomaterials*. 2008, 29, 1912-9.
- 25 Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U Simon, G Schmid, W Brandau, W Jahnke-Dechent. *Small*. 2007, 3, 1941-9.
- 26 E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole , , C. J. Murphy and M. D. Wyatt, *Small* 2005, 1, 325 –327.
- 27 S. Tatur, M. Maccarini, R. Barker, A. Nelson and G. Fragneto, *Langmuir*, 2013, 29, pp 6606–6614.
- 28 Bôa ISF, Porto ML, Pereira ACH, Ramos JPL, Scherer R, Oliveira JP, et al. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. *PLoS ONE*. 2015, 10.
- 29 SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 2009, 112, p. 654-658.
- 30 I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Analytical Biochemistry*. 1996, 239, p.70-76.
- 31 S. Kumar, K. S. Gandhi, R. Kumar. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007, 46 , , pp 3128–3136.
- 32 J. Wang, N. Zhou, Z. Zhu, J. Huang, G. Li Detection of flavonoids and assay for their antioxidant activity based on enlargement of gold nanoparticles. 2007, 388, pp 1199–1205.
- 33 A. MUTHUVEL et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 2014, 4, p. 325–332.

- 34 R. M. Silverstein, F. X. Webster, D J D Kiemle. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. LTC, 2007.
- 35 J F Kennedy, G. O. Phillips, P A Williams. Recent Advances in Environmentally Compatible Polymers: Cellucon '99 Proceedings. Woodhead published limited, 2001.
- 36 D. W. Mayo, F. A. Miller, R. W. Hannah. Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra Ed. John Wiley & Sons, 2003.
- 37 R. N. Castle. The chemistry of Heterocyclic compounds Pyridazines. Ed. John Wiley & Sons, 2009.
- 38 R. Lévy, N. T. K. Thanh, R. C. Doty, I. Hussain, R. J. Nichols, D. J. Schiffrin, M. Brust , , and D. G. Fernig. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. 2004, 126, pp.10076–10084.
- 39 Z. Nie, K.J. Liu, C.J. Zhong, L.F. Wang, Y, . Yang, Q. Tian, Y. Liu. Free Radic Biol Med. 2007, 43, 1243-54.
- 40 D. Krishnaiah, A. Bono, R. Sarbatly, S.M. Anisuzzaman Journal of King Saud University – Engineering Sciences 2015, 27, 63–67.